

Karakterisering av Ca^{2+} -avhengig glutamaterg eksitotoksisitet i cerebellære granulærceller

av Andrea Domazet



Avdeling for Farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk Institutt

Det Matematisk-Naturvitenskapelige Fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

November 2010

Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Forsvarets Forskningsinstitutt ved avdeling Beskyttelse på Kjeller, i perioden august 2009 til november 2010, og er et ledd i cand. pharm. graden i farmasi ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Jeg vil spesielt takke min veileder, Avi Ring, for fremragende veiledning og god støtte på alle måter. Han har alltid tatt seg tid til å hjelpe med faglig ekspertise, gode råd og stor tålmodighet.

En stor takk går også til professor Ragnhild Paulsen som har kommet med nyttige råd underveis og viktige kommentarer på oppgaven.

Videre vil jeg takke Rita Tansø for hjelp og opplæring knyttet til laboratoriearbeid og for gjennomlesing av oppgaven.

Takk til FFI som har stilt utstyr og midler til disposisjon. Takk til alle på FFI som har bidratt til et hyggelig miljø på avdelingen.

Til slutt vil jeg takke min familie for stor støtte og tålmodighet.

Kjeller, november 2010

Andrea Domazet

INNHOILDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	5
FORKORTELSER.....	6
1 INNLEDNING.....	8
1.1 Glutamat og glutamaterge reseptorer.....	9
1.1.1 NMDA-reseptor	10
1.1.2 AMPA/kainatreseptorer	14
1.1.3 Metabotrope glutamatreseptorer	15
1.2 Kalsium.....	15
1.2.1 Kalsium (Ca^{2+}) signalering	15
1.2.2 Ca^{2+} - ”på”-mekanismer.....	16
1.2.3 Ca^{2+} - ”av”-mekanismer.....	18
1.3 Eksitotoksisitet.....	20
1.4 Apoptose og nekrose.....	23
1.5 Cellelinjen SH-SY5Y	24
1.6 Granulærceiler	24
1.7 Målsettinger	27
2 METODER OG MATERIALER	28
2.1 Kjemikalier	28
2.2 Tillaging av cerebellære graunlærceiler	30
2.2.1 Løsninger for preparering av cerebellære granulærceiler.....	30
2.2.2 Dyr	31
2.2.3 Autoklaving	31
2.2.4 Preparering av brett og dekkglass	31
2.2.5 Tillaging av cellekulturmedium.....	32
2.2.6 Prosedyre for celledyrking.....	33
2.3 Dyrking av SH-SY5Y cellelinje	34
2.4 Måling av intracellulær Ca^{2+}	35
2.4.1 Plateleser.....	37
2.4.2 Enkeltcelle imaging	39
2.5 Måling av intracellulær Na^{+}	42
2.6 Måling av toksisitet.....	42
2.6.1 LDH-frisetting	44

2.6.2	Oksygen og glukose deprivasjon (OGD).....	45
2.7	Dataanalyse.....	46
3	RESULTATER.....	47
3.1	Enkeltcelle imaging	47
3.2	Karakterisering av Ca^{2+} i cerebellære granulærceller	49
3.2.1	NMDA dose-respons i cerebellære granulærceller.....	49
3.2.2	Karakterisering av $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -økning med ionomycin.....	50
3.2.3	Karakterisering av $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -økning med K^+ -depolarisering.....	53
3.2.4	Karakterisering av $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -økning med K^+ -depolarisering og ionomycin....	55
3.2.5	Kainat-indusert $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -økning.....	59
3.2.6	Effekt på $[\text{Ca}^{2+}]_i$ med blokkering av Na^+/K^+ -ATPase.....	61
3.2.7	Effekt på $[\text{Ca}^{2+}]_i$ med blokkering av PMCA	62
3.2.8	$[\text{Na}^+]_i$ -økning ved aktivering av NMDAR og depolarisering	64
3.3	Celledød under Ca^{2+} -belastning	65
3.3.1	Glutamaterg celledød	65
3.3.2	OGD-indusert celledød	67
3.3.3	Ouabain-indusert celledød	68
3.3.4	Ionomycin-indusert celledød	69
3.4	Aktivering av NMDAR med samtidig blokkering av ioneinfluks.....	70
3.4.1	Blokkering av NMDAR med GK11	70
3.4.2	NMDA og MK-801 i kombinasjon med K^+ -depolarisering	72
3.4.3	NMDA og MK-801 i kombinasjon med ionomycin.....	74
3.4.4	NMDA og MK-801 med preinkubering og K^+ -depolarisering.....	75
3.5	Test av interferens av ionekanalhemmere	77
3.5.1	MK-801 interferens med ionomycin i SH-SY5Y	77
3.5.2	NMDAR - inhibitor-blokkering av Ca^{2+} -influks i SH-SY5Y	78
3.5.3	NMDAR-inhibitor-blokkering av Ca^{2+} -influks i rCGN.....	79
4	DISKUSJON.....	80
4.1	NMDA-mediert $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -økning og toksisitet.....	80
4.2	Økning i $[\text{Ca}^{2+}]_i$ med preinkubering og K^+ -depolarisering.....	82
4.3	Ca^{2+} -overbelastning er ikke årsak til NMDA-indusert celledød.....	86
4.4	Forslag til videre studier	90
4.5	Konklusjon.....	91
	LITTERATURLISTE.....	92

SAMMENDRAG

Eksitotoksisitet bidrar til nevronal degenerasjon i mange akutte og kroniske CNS sykdommer, inkluderende epilepsi, hjerneslag og Alzheimers sykdom. Hovedmediator til eksitotoksisk skade er kalsium (Ca^{2+}), som under normale forhold styrer mange cellulære prosesser. Ca^{2+} -influxveien er viktig ved eksitotoksisitet hvor NMDA-reseptoren (NMDAR) er hovedaktør. Cerebellære granulærceller fra rotte ble brukt for å studere Ca^{2+} -belastningen ved hjelp av fluoriserende prober (fura-2, SBFI). Det ble forsøkt å øke Ca^{2+} via andre influxveier enn gjennom NMDAR, for å sammenligne med NMDAR-indusert Ca^{2+} -influx og toksisitet. Ca^{2+} -innstrømning via NMDAR var toksisk; hvor Ca^{2+} -innstrømning via K^+ -depolarisering, hemming av Na^+/K^+ -ATPasen eller PMCA og aktivering av AMPA/kainat reseptorer ikke var skadelig for cellen, når $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ble økt til samme nivå som med NMDA. Kombinasjon av ionomycin og K^+ -depolarisering førte til toksisitet på grunn av Ca^{2+} -overbelastning.

Ettersom det er mulig at det er den lokale Ca^{2+} -konsentrasjon ved NMDAR på innsiden av membranen, samtidig med en aktivert NMDAR, men ikke nødvendigvis influxveien, som er avgjørende for toksisitet, ble det testet å aktivere NMDAR med NMDA og glysin, men samtidig blokkere Ca^{2+} -influxveien med ionekanalhemmere. Samtidig ble det prøvd å øke Ca^{2+} via andre Ca^{2+} -influxveier. Inhibisjon av NMDAR med en ny ionekanalhemmer, GK11, ble først prøvd, men den viste seg å være spenningsavhengig. En separat studie av spenningsavhengighet av to ionekanalhemmere, MK-801 og procyclidin, ble utført i både rCGN og i cellelinjen SH-SY5Y. Procyclidin hemmet K^+ -depolariseringsindusert influx, mens MK-801 ikke ga signifikant inhibisjonseffekt opp til 10 μM .

Vi konkluderer at celledød ved NMDAR-stimulering avhenger av Ca^{2+} -influx. Den glutamaterge eksitotoksisiteten fås ved cytosoliske Ca^{2+} -nivåer under 500 nM og er distinkt forskjellig fra en toksisitet som man får fra Ca^{2+} -overbelastning ved høyere intracellulære Ca^{2+} -nivåer (ca. 1 μM) og som ikke er avhengig av NMDAR-aktivering.

FORKORTELSER

AIF	Apoptose induserende faktor
AMPA	α -amino-3-hydroksy-5-metyl-4-isoxazole propionic acid
AMPAR	α -amino-3-hydroksy-5-metyl-4-isoxazole propionic acid – reseptor
APV	D-2-amino-phosphono-pentanoic acid
ATP	Adenosin trifosfat
Ca^{2+}	Kalsium
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Intracellulær kalsium konsentrasjon
CAM	Kalmodulin
cAMP	syklisk adenosinmonofosfat
CGN	Cerebellære granulærceller (cerebellar granule neurons)
CNS	Sentralnervesystemet (central nervous system)
cyt c	Cytokrom c
DCKA	5,7-dichlorokynurenic acid
DIV	Dager <i>in vitro</i>
DMSO	Dimetylsulfoksid
EAAT	Eksitatorisk-aminosyretransportør (excitatory amino acid transporter)
EC_{50}	Konsentrasjon av et stoff som gir 50 % av maksimum respons
ER	Endoplasmatisk retikulum
HVA	Høyspenningsaktivert (high voltage activated)
IP_3	Inositoltrifosfat
IP_3R	Inositoltrifosfat reseptor
K^+	Kalium
mCGN	Cerebellære granulærceller fra mus
Mg^{2+}	Magnesium
Na^+	Natrium
NCX	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -utbytter ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger)
NCKX	Kalium avhengig $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -utbytter (K^+ -dependent $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger)
NMDA	N-metyl-D-aspartat
NMDAR	N-metyl-D-aspartat – reseptor
NO	Nitrogenoksid

nNOS	Nevronal nitrogenoksid syntase
PKG	Proteinkinase G
PLC	Fosfolipase C
PMCA	Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase
rCGN	Cerebellære granulærceller fra rotte
ROC	Reseptorstyrt kanal (receptor operated channel)
SBFI	Natriumbindende benzofuran isoftalat (sodium binding benzofuran isophtalate)
SERCA	Sarkoplasmatisk/Endoplasmatisk Ca^{2+} -ATPase
SOC	Lagerstyrt kanal (store operated channel)
VOC	Spenningsstyrt kanal (voltage operated channel)
Zn^{2+}	Sink

1 INNLEDNING

Glutamat er den viktigste eksitatoriske nevrotransmitteren for hjernens funksjon, men også en av de farligste truslene som kan gi nevrodegenerasjon i flere deler av hjernen. Nerveceller som utsettes for stress, for eksempel ved hjerneslag eller sykdommer som epilepsi og Alzheimers sykdom kan dø av at for mye glutamat frisettes. Når glutamat frisettes i synapsespalten fører det til aktivering av glutamaterge reseptorer. Kationer som Ca^{2+} og Na^{+} vil strømme inn i den postsynaptiske cellen. Dette kan resultere i opphopning av Ca^{2+} intracellulært som påvirker mange prosesser i cellen som kan føre til dysfunksjon og død. En kjent hypotese som uttrykker dette blir kalt for glutamat-eksitotoksitet (Olney 1986; Choi 1988). Mekanismer som ligger bak denne prosessen er komplekse og fortsatt uklare, men en mekanisme som antas å være viktig er relatert til det som er nevnt ovenfor, nemlig Ca^{2+} -belastning på grunn av overstimulering fra glutamat (Dong et al. 2009).

Denne toksiske effekten av glutamat i hjernen ble beskrevet i 1969 (Olney 1969) og siden da har glutamatreseptoren vært en av de mest undersøkte mål for nevroproteksjon. Tross mange mislykkede kliniske forsøk (Ginsberg 2008) de siste 10-20 årene er det fortsatt av interesse å studere antagelser rundt Ca^{2+} -overbelastning og toksitet.

Dyrkede nerveceller ble brukt for å studere disse mekanismene. Nervecellene ble ladet med fluoriserende prober (fura-2, SBFI) og eksitasjonstilstanden ble fulgt for å se hvordan viktige signaler endres i cellen når den stimuleres eller utsettes for stress.

Målet med oppgaven var å studere hvordan aktivitet/stimulering av nerveceller påvirker nervecellenes overlevelse og å sammenlikne betydningen av Ca^{2+} -overbelastning og betydningen til glutamat reseptor stimulering ved depolarisering av cellen.

Innledningen konsentrerer seg derfor på å forklare bakgrunnen for glutamaterg-stimulering, Ca^{2+} -homeostase og de eksitatoriske mekanismene.

1.1 Glutamat og glutamaterge reseptorer

Glutamaterg nevrotransmisjon er involvert i bl.a. motorisk koordinasjon, hukommelse og læring. 90 % av nevronene i hjernen bruker glutamat som nevrotransmitter og 80-90 % av synapsene i hjernen er glutamaterge (Braitenberg and Schüz 1998).

Det er viktig at glutamat fjernes raskt fra den synaptiske spalten etter stimulering av reseptorene for å unngå eksitotoksisitet. Detaljene er ikke helt klare om hvordan unormalt forhøyet glutamat fører til celledød, men det finnes flere veier (såkalte ”*death pathways*”) som involverer stimulering av glutamatreseptorer, intracellulær Ca^{2+} og Na^{+} -overbelastning og apoptotiske signaler (se nedenfor).

Glutamat blir tatt opp tilbake til nerveceller og i nærliggende gliaceller via glutamattransportører (EAAT - excitatory amino acid transporter), hvor den blir omdannet til glutamin. Glutamin, også en aminosyre, blir fraktet tilbake til nerveterminalene hvor den igjen omdannes til glutamat. Glutamat frisettes til den synaptiske spalten hvor den bindes spesifikt til pre- og postsynaptiske glutamatreseptorer (Hassel and Dingledine 2006; Boulland and Levy 2005). Disse deles inn i to kategorier: ionotrope og metabotrope glutamatreseptorer. Metabotrope reseptorer medierer sin aktivering gjennom GTP-bindende proteiner som genererer signaler hvilke fører til mobilisering av Ca^{2+} fra intracellulære lagre (Arundine and Tymianski 2003).

Gruppen av ionotrope reseptorer omfatter tre hovedklasser: NMDA (N-metyl-D-aspartat)-reseptorer, AMPA (α -amino-3-hydroksy-5-metyl-4-isoxazole propionic acid)-reseptorer og kainatreseptorer som er navngitt etter sine selektive agonister (Wollmuth and Sobolevsky 2004). NMDA-reseptorer (NMDAR) og AMPA-reseptorer (AMPA) mobiliserer Ca^{2+} - økning fra ekstracellulær Ca^{2+} gjennom åpning av ione kanaler.

I oppgaven legges det mest vekt på NMDAR, siden den antas å være hovedansvarlig når det gjelder eksitotoksisitet.

1.1.1 NMDA-reseptor

Struktur

I NMDAR er agonist-bindingssetet og den tilhørende ionekanalen inkorporert i samme makromolekylære kompleks. Den er lokalisert i cellemembranen og er permeabel for små kationer som Na^+ , K^+ og Ca^{2+} . Reseptorene finnes i tillegg til i nevroner i astrocytter, oligodendrocytter, og også i ikke-nevronale celler som bl.a. osteoklaster hvor dets funksjon fortsatt er uklar (Hardingham 2009).

Strukturelt, er NMDAR heterotetramere komplekser, som består av to glysin-bindende NR1-subenheter og to glutamat-bindende NR2-subenheter. NR1-subenhet er viktig for reseptorens funksjon og har flere varianter, NR1A-H (Arundine and Tymianski 2003). I tillegg til disse finnes det fire ulike NR2-subenheter (A-D) men også to NR3-subenheter (A og B) som gir variabilitet til reseptoren (Hardingham 2009).

Ulike kombinasjoner av NR1 og NR2-subenheter resulterer i en rekke forskjellige reseptorkomplekser som gir ulik affinitet til ligander og dynamiske egenskaper.

Forskjellige NR1 varianter har ulik sensitivitet til agonister, antagonist, Zn^{2+} , Ca^{2+} , polyaminer men også til binding til intracellulære proteiner (Arundine and Tymianski 2003).

Inkorporering av NR2-subenheter bestemmer biofysiologiske egenskaper til ionekanalene, som åpningstid, ledningsevne og sensitivitet til Mg^{2+} -blokkering (Villmann and Becker 2007).

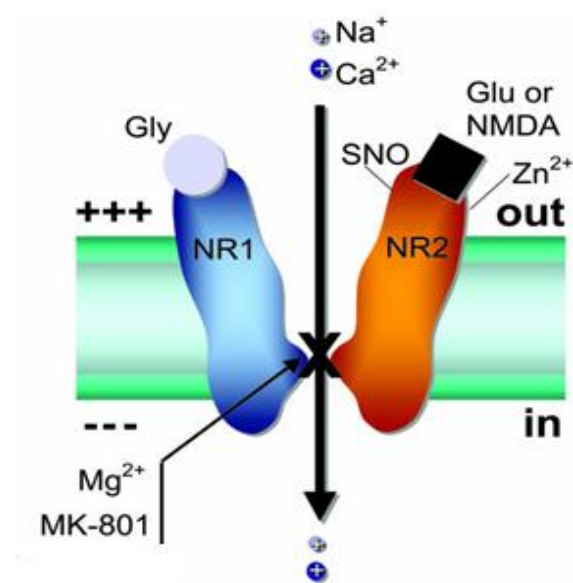
Den mest utbredte NMDAR inneholder NR1-subenhet og enten NR2A eller NR2B eller en blanding av disse to (Hardingham 2009). Disse typer reseptorer har høy Ca^{2+} -permeabilitet. Når NR3-subenheten inkorporeres i et kompleks sammen med NR1 og NR2-subenheter vil Ca^{2+} -permeabiliteten reduseres (Villmann and Becker 2007; Chatterton et al. 2002).

NR1 og NR3-subenheter kan danne eksitatoriske glysinreseptorer (blir aktivert av glysin) det vil si uten agonister som glutamat eller NMDA (Chatterton et al. 2002).

Binding til reseptoren

Når en agonist bindes til reseptoren fører det til en endring i konformasjon i reseptoren som øker sannsynligheten til kanalåpning.

Det er seks forskjellige bindingssteder for endogene ligander som kan påvirke muligheten av åpningen til ionekanalene (noen er vist i figur 1.1). De to viktigste er steder for co-agonister glysin og glutamat (eller NMDA) som kreves for at reseptoren kan aktiveres. De andre er steder for polyaminer, Mg^{2+} , H^+ og Zn^{2+} som hemmer innstrømming av ioner gjennom reseptoren når den er bundet til en agonist (Chen and Lipton 2006).



Figur 1.1 NMDA-reseptor med subenheter og bindingsteder for forskjellige stoffer er vist. Glu or NMDA: glutamat eller NMDA; Gly: glysin; SNO: cystein sulfhydryl gruppe (-SH) reagerende med nitrogenoksid (NO); Zn^{2+} : sink; NR1,NR2: NMDAR subenhet 1 og subenhet 2; X: viser inhibisjon av MK-801 og Mg^{2+} i ionekanalene (Lipton 2004)

NMDAR-ione kanalen er blokkert av Mg^{2+} og blokkeringen er spenningsavhengig. Membranpotensialet til en nervecelle som er i hvile er negativ og den fysiologiske konsentrasjon av Mg^{2+} ekstracellulært er nok til å hemme innstrømming av ioner gjennom NMDAR-kanaler.

Det negative membranpotensialet "fanger" Mg^{2+} -ionet som blokkerer ionestrømmen, selv om reseptoren er aktivert av agonister som glutamat og glysin.

Når membranpotensialet begynner å bli mindre negativt, eller til og med positivt, minsker affiniteten til Mg^{2+} og blokkeringen opphører. Mg^{2+} dissosierer fra ione kanalen.

Frigjøring av glutamat i synapsen fører til innstrømming av Na^+ gjennom AMPAR i den postsynaptiske cellen og dette resulterer i depolarisering av membranen som er nok til at Mg^{2+} fjernes fra NMDAR-kanalen og blokkeringen oppheves. Som nevnt, er NMDAR permeabel for Na^+ , K^+ og Ca^{2+} , men Ca^{2+} medierer det meste av de fysiologiske effekter av NMDAR aktivitet (Villmann and Becker 2007).

Antagonister

Kationkanalen blokkeres også av andre ikke-kompetitive antagonister enn Mg^{2+} . Eksempler som kan nevnes er MK-801 (dizocilpine), memantin og ketamin. I likhet med Mg^{2+} virker MK-801 som en åpen-kanal-hemmer ("open-channel blocker") av NMDAR (Villmann and Becker 2007). En lignende hemmer er gacyclidin (GK 11). Denne er utledet fra phencyclidin (PCP) hvilket også er en NMDA-antagonist og brukes bl.a. ved schizofreni (Murray 2002). GK 11 sies å ha lignende nevroprotektive egenskaper som MK-801, men er ikke like toksisk for nevroner som MK-801 (Hirbec et al. 2001; Vandame et al. 2007).

Flere antagonister som kan nevnes er APV (D-2-amino-phosphono-pentanoic acid, kalles også for AP5) og DCKA (5,7-dichlorokynurenic acid). APV er en selektiv kompetitiv antagonist som blokkerer bindingssetet til liganden glutamat (Morris 1989), mens DCKA blokkerer bindingssetet til glysin (McNamara 1990), slik at reseptoren ikke kan aktiveres.

Intracellulær signalering

Reseptorsubenheterne interagerer med flere proteiner som er assosiert med den postsynaptiske membranen. Et viktig protein er PSD-95 (postsynaptic density 95). NR2-subenheten bindes med sitt cytoplasmiske C-terminal til PDZ domenet av PSD-95 (Arundine and Tymianski 2004). Gjennom disse proteiner medieres mange effekter av reseptoren.

Når Ca^{2+} strømmer inn i den postsynaptiske cellen gjennom NMDAR, bindes den til kalmodulin (CAM). Hovedoppgaven til kalmodulin er å stimulere mange proteinkinaser, som Ca^{2+} -kalmodulin-avhengig kinase II (CaM kinase II) hvilket igjen kan fosforilere en rekke andre proteiner. Ca^{2+} -kalmodulin kompleks kan i tillegg aktivere nNOS (nevronal nitrogenoksid syntase) som bindes til PDZ-domenet til PSD-95 (Arundine and Tymianski 2003). Aktivert nNOS produserer NO (nitrogenoksid) som igjen aktiverer guanylat syklase. Det er et enzym som katalyserer omdanning av GTP til cGMP som igjen aktiverer PKG (Brown 2010). En annen viktig effekt av NO er nitrosylering av cystein-tiol gruppen på NMDAR som fører til redusert overdreven aktivitet av reseptoren (Chen and Lipton 2006).

Lokalisering av NMDAR

I tillegg til intensiteten til stimuleringen, er lokalisering av NMDAR viktig og kan påvirke signaler fra reseptoren. Nevroner besitter en mengde NMDAR som sitter både synaptisk og ekstrasynaptisk, hvilke gir forskjellige signaler i cellen (Hardingham 2009). Aktivering av reseptoren kan føre til enten celleoverlevelse eller celledød avhengig av hvor reseptoren er lokalisert; synaptisk eller ekstrasynaptisk (Besancon et al. 2008).

Aktivering av synaptiske NMDAR fremmer celleoverlevelse ved aktivering av CaM kinase ("Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase") og "Ras-ERK1/2 pathways" (ekstracellulær signal-regulert kinase), men også påfølgende uttrykk av BDNF ("brain-derived neurotrophic factor"). Aktivering av ekstrasynaptiske NMDAR derimot, inaktiverer "CREB-pathway" (cAMP response element-binding protein) og nedregulerer BDNF (Besancon et al. 2008).

1.1.2 AMPA/kainatreseptorer

AMPA er utbredt over hele CNS og er mest lokalisert på den postsynaptiske membranen. De består av en kombinasjon av fire subenheter (GluR 1-4) og krever kun glutamat for aktivering (Arundine and Tymianski 2003).

Kationinfluks gjennom AMPAR avhenger av hvilken subtype reseptoren består av. GluR1, 3 og 4 er permeable for Ca^{2+} , mens GluR2 hindrer Ca^{2+} -permeabilitet (Lau and Tymianski 2010). Fysiologisk regulerer AMPAR den raske depolariseringen for å fjerne Mg^{2+} -blokkering av nærliggende NMDAR (Villmann and Becker 2007) som nevnt tidligere (se avsnitt 1.1.1).

AMPA kan være involvert i eksitotoksisitet siden noen av reseptorene er Ca^{2+} -permeable og kan bidra til nevronale celledød-prosesser som er induisert av Ca^{2+} -overbelastning (Dong et al. 2009).

Subenhetene til kainatreseptorer er GluR 5-7 i tillegg til KA1 og KA2 (også kjent som GluK 1-2). Egenskapene til reseptorene ligner på AMPAR ved at ioneinfluks skjer på grunn av glutamatbinding til reseptoren, men disse er impermeable for Ca^{2+} -ioner.

Studier har vist at kainatreseptorer kan finnes både pre- og postsynaptisk og at anvendelse av kainat stimulerte glutamat frigjøring (Vignes and Collingridge 1997).

Derimot har andre studier vist at kainat hemmet presynaptisk glutamat frigjøring (Frerking et al. 2001)

Kainatreseptorer som er postsynaptisk har samme hensikt som AMPAR, nemlig å fjerne Mg^{2+} -blokkering i NMDAR (Lau and Tymianski 2010). Kainatreseptorer er ikke like utbredt i CNS som AMPAR.

1.1.3 Metabotrope glutamatreseptorer

Metabotrope glutamatreseptorer (mGluR) er proteiner som er koblet til intracellulære GTP-bindende proteiner. Synaptisk transmisjon som formidles av slike reseptorer, er langsommere enn de som er direkte koblet til ionekanaler.

Åtte forskjellige reseptorer er kjent (mGluR 1-8) og klassifiseres i tre grupper, I, II og III. Gruppe I (mGluR1 og 5) stimulerer fosfolipase C (PLC) aktivitet, IP_3 produksjon og frigjøring av Ca^{2+} fra cytoplasmiske lagre (Conn 2003).

Aktivering av gruppe II og III fører til hemming av adenylat syklase aktivitet som igjen resulterer i hemming av spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler (Chavis et al. 1994).

Når det gjelder eksitotoksisitet, potenserer gruppe I reseptorer NMDA-medierte Ca^{2+} -influks, mens de andre gruppene er knyttet til hemming av cAMP dannelse. De reduserer Ca^{2+} -influks gjennom NMDAR (Bruno et al. 1995).

1.2 Kalsium

1.2.1 Kalsium (Ca^{2+}) signalering

I 1947 viste forskere at Ca^{2+} fungerte som en intracellulær mediator. En liten mengde Ca^{2+} ble injisert intracellulært, og det førte til kontraksjon av en skjelettmuskelcelle (Heilbrunn and Wiercinsky 1947). Etter hvert ble det kjent at Ca^{2+} -ioner spiller en sentral rolle i reguleringen av mange andre former for cellulær aktivitet. Utslipp av neurotransmitter (eksocytose) er et eksempel, men Ca^{2+} er innblandet i mange andre prosesser; som metabolisme, synaptisk plastisitet, celleproliferasjon og celledød (Berridge 1997).

I eukaryote celler er intracellulær Ca^{2+} -konsentrasjon direkte korrelert til den fysiologiske statusen av cellen. Siden Ca^{2+} er et signalmolekyl må den intracellulære konsentrasjonen være lav. Når cellen er i ro, er konsentrasjonen rundt 10-100 nM. Ved stimulering av cellen øker konsentrasjon til et høyere nivå (200-1000 nM) som er nok til at Ca^{2+} -avhengige prosesser blir aktivert (Berridge and Bootman 1996).

Ca^{2+} -ioner som fører til en intracellulær Ca^{2+} -signal, kan komme fra utsiden av cellen gjennom kanaler i plasmamembranen, eller fra intracellulære lagre. Ca^{2+} -innstrømning blir favorisert av en stor elektrokjemisk gradient, da $[\text{Ca}^{2+}]$ på utsiden av cellen er 10 000 ganger større enn innsiden som er negativ ladet. Dette blir kalt for på-mekanismer. Av-mekanismer sørger for at Ca^{2+} -konsentrasjon i cytoplasma reduseres gjennom binding til Ca^{2+} -buffrende proteiner som enten pumper ionet ut av cellen eller tilbake til de interne lagre (figur 1.2) (Wojda et al. 2008).

1.2.2 Ca^{2+} - ”på”-mekanismer

Plasmamembranen inneholder en rekke kanaler som har muligheten til å regulere Ca^{2+} -innstrømning fra den ekstracellulære væsken. Disse deles inn etter deres aktiveringsmekanisme: spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler (VOC – voltage-operated channels), reseptorstyrte kanaler (ROC – receptor-operated channels) og lagerstyrte kanaler (SOC – store-operated channels) (Wojda et al. 2008; Bootman et al. 2001).

- VOC: Disse finnes for det meste i eksiterbare celler som nerveceller, muskelceller og i noen endokrine celler. Kanalene åpnes i respons til depolarisering av plasmamembranen (eller ved åpning av ROC) (Wojda et al. 2008) og Ca^{2+} kan strømme inn. Det finnes flere typer av VOC; lavspenningskanaler (T-type) og høyspenningskanaler (HVA-kanaler; P/Q, N, R og L-type) (Berridge and Bootman 1996). Disse går under flere navn, se tabell under (Catterall et al. 2005).

Tabell 1.1 Ny nomenklatur av spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler (Catterall et al. 2005).

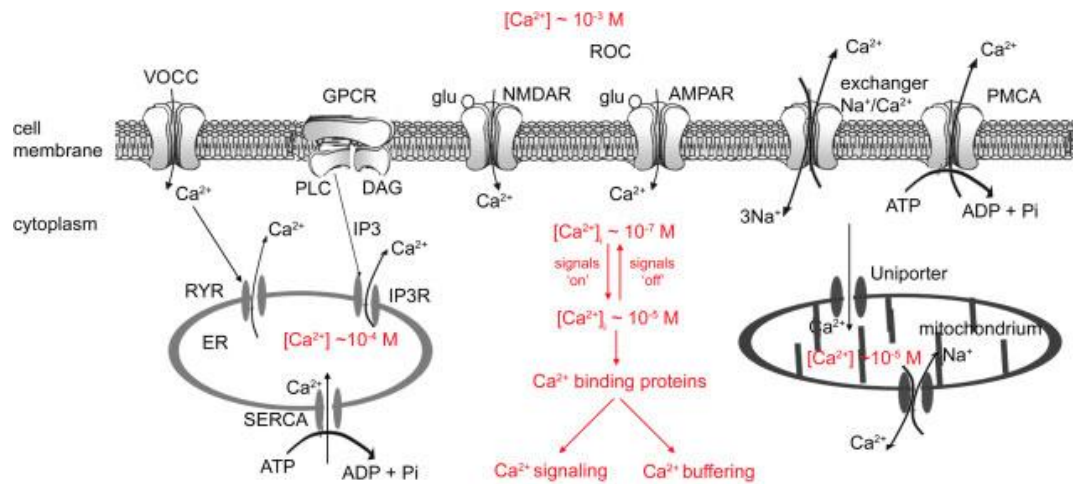
Tidligere navn	L	P/Q	N	R	T
Nytt navn	Ca_v 1.1-1.4	Ca_v 2.1	Ca_v 2.2	Ca_v 2.3	Ca_v 3.1-3.3

- ROC: aktiveres ved binding av ekstracellulære agonister, oftest neurotransmittorer som glutamat. NMDAR er et eksempel på ROC, hvor binding av en ligand fører til konformasjonsendring og dermed blir reseptoren permeabel for Ca^{2+} (Rang et al. 2003)
- SOC: aktiveres når intracellulære lagre er tomme for Ca^{2+} , for eksempel i endoplasmatisk retikulum (ER). Selv om det var flere antagelser, var identiteten av SOC og koblingen mellom SOC-åpning og ER-lagre ukjent (Bootman et al. 2001), inntil en oppdagelse av proteinene STIM1 og Orai1 (Hewavitharana et al. 2007). STIM1 fungerer som en Ca^{2+} -sensor i ER som sitter på membranen til ER. Når Ca^{2+} -lagre tømmes, translokerer denne i ER membranen og tiltrekkes Orai1 som er et plasmamembranprotein. Kombinasjon av disse to proteiner resulterer i mediert Ca^{2+} -innstrømning over plasmamembranen (Hewavitharana et al. 2007). Det er fortsatt uklart om en annen type av kanal kalt TRP (transient receptor potential) også er involvert (Scott et al. 2003).

Intracellulære Ca^{2+} -kanaler

Ca^{2+} -frigjøring fra intracellulære lagre i nevroner som ER og SR skjer via flere typer Ca^{2+} -kanaler/reseptorer: IP_3 reseptorer (IP_3R), ryanodin reseptorer (RyR) (Berridge and Bootman 1996) og nylig oppdaget NAADP reseptorer (NAADPR) (Galione and Petersen 2005).

Ca^{2+} -utslipp gjennom IP_3R krever binding av den sekundære budbringeren IP_3 som genereres fra PLC i respons til aktivering av en rekke G-protein koblede reseptorer (GPCR). Ved binding av IP_3 til IP_3R endres konformasjon til reseptoren slik at kanalen åpnes og Ca^{2+} strømmer ut i cytosolen. Selv om binding av IP_3 er viktig for at kanalen åpnes, er kanalens aktivering også avhengig av Ca^{2+} og pH i cytosolen. Det er også mulig at en høy konsentrasjon av Ca^{2+} hemmer disse reseptorene (Bootman et al. 2001). RyR er strukturelt og funksjonelt lik IP_3R . Økt cytoplasmisk Ca^{2+} er hovedtriggeren for Ca^{2+} -frigjøring via RyR noe som kalles for Ca^{2+} -indusert Ca^{2+} - frigjøring (CICR) (Wojda et al. 2008).



Figur 1.2 Mekanismer som er involvert i opprettholdelsen av Ca^{2+} -homeostasen i nevroner.

På-mekanismer sørger for økning av Ca^{2+} i cytosolen, enten via innstrømning fra utsiden av cellen, eller fra intracellulære lagre. Av-mekanismer sørger for reduksjon av intracellulær Ca^{2+} -konsentrasjon, enten via Na^{+}/Ca^{2+} -utbyteren, lokalisert i plasmamembranen eller flere Ca^{2+} -ATPaser som pumper Ca^{2+} inn i organeller eller ut av cellen. For mer forklaring, se tekst (Wojda et al. 2008).

1.2.3 Ca^{2+} - "av"-mekanismer

For at Ca^{2+} -signaleringsfunksjon skal fortsette å være operativ, må Ca^{2+} også fjernes fra cellen ("av"-mekanismer). Det sørger for reduksjon av fri cytoplasmisk Ca^{2+} og til gjenoppretting av normal Ca^{2+} -nivå. Pumper som finnes i plasmamembranen og ER, men også mitokondrier er involvert i denne mekanismen.

- Na^{+}/Ca^{2+} -utbytter, NCX, og kalium avhengig Na^{+}/Ca^{2+} -utbytter, NCKX, er blant de mest potente regulatorer av $[Ca^{2+}]$ i nevronale celler som er lokalisert i plasmamembranen. NCX finnes i tre isoformer; NCX1-3 (Li and Matsouka 1994) og NCKX i fire; NCKX1-4 (Kiedrowski et al. 2004). Transportørenes nedregulering vil resultere i Ca^{2+} -overbelastning og skade på cellen. NCX/NCKX er toveis-membrantransportører som transporterer Ca^{2+}/K^{+} ut av cellen og Na^{+} inn i cellen (3 Na^{+} mot 1 Ca^{2+} ; resp. 4 Na^{+} mot 1 Ca^{2+} og 1 K^{+}). Transportørene kan virke i begge retninger og aktiviteten er regulert av mange faktorer som Na^{+} , K^{+} , Ca^{2+} , pH og fosforylering (Besancon et al. 2008). Ved K^{+} -depolarisering reduseres drivkraften for Ca^{2+} -transport kraftig, spesielt for NCKX, slik at den kan gå i revers modus (Ca^{2+} transporteres inn i cellen).

- Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA) er et transportprotein som ligger i plasmamembranen og sørger for reduksjon av $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Denne såkalte Ca^{2+} -pumpen er drevet av hydrolysen av ATP, med en støkiometri av en Ca^{2+} -ion for hver ATP-molekyl hydrolysert. I motsetning til NCX som har lav affinitet til Ca^{2+} men høy transport kapasitet, har PMCA høy affinitet men lav kapasitet (Albers and Siegel 2006). PMCA er derfor viktigst når Ca^{2+} -konsentrasjon nærmer seg ”hvile”-nivået.
- Sarco/endoplasmatisk retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) er en ”pumpe” som er lokalisert i membranen til ER/SR og bruker energien til ATP for å transportere Ca^{2+} mot sin gradient fra cytoplasma til ER/SR (Berridge and Bootman 1996).
- Mitokondrier kan betraktes som Ca^{2+} -lagre, da de kan inneholde Ca^{2+} utover den gjennomsnittskonsentrasjon man finner i cytoplasma. De har en vesentlig kapasitet for Ca^{2+} -opptak fra cytoplasma og bufrer cytosoliske Ca^{2+} -økninger ved nevrotransmisjon.
Mitokondrier har ingen spesifikk Ca^{2+} -transportør men akkumulerer Ca^{2+} via en ”uniporter” som er drevet av mitokondrienes negative membranpotensial (Wojda et al. 2008).

I tillegg til disse mekanismene finnes det buffere i cytoplasma som binder Ca^{2+} og er dermed viktige for reguleringen. Parvalbumin, calbindin og calretinin er noen av disse (Berridge and Bootman 1996). De er proteiner med flere såkalte ”*EF-hand*” høy affinitets bindingssteder for Ca^{2+} (Kawasaki et al. 1998).

Som nevnt regulerer Ca^{2+} cellulære prosesser, bl.a. aktiviteten til mange proteiner, spesielt kinaser og fosfataser. I de fleste tilfellene tjener Ca^{2+} -bindingsprotein som et intermediat (mellomledd) mellom Ca^{2+} og målproteinet. Den mest kjente er kalmodulin (CAM), en såkalt Ca^{2+} -sensor. Proteinets har fire Ca^{2+} -bindingssteder (”EF-hands”) og når alle er opptatt gjennomgår den en konformasjonsendring som muliggjør binding til andre viktige målproteiner, for eksempel stimulering av en rekke proteinkinaser (CaM kinase II), aktivisering av PMCA og dannelse av NO via nNOS (Berridge and Bootman 1996; Brown 2010).

1.3 Eksitotoksisitet

Til tross for intens forskning på mekanismer for eksitotoksisitet, er de intracellulære mekanismene som er ansvarlige for nevronal død fortsatt uklare.

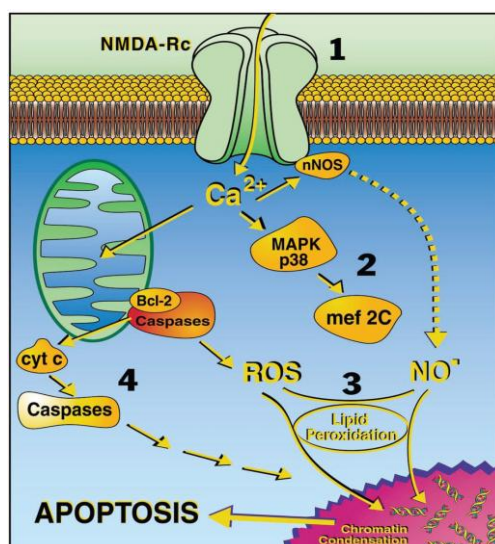
Eksitotoksisitet er en prosess som viser til glutamats (og andre eksitatoriske aminosyrers) evne til å ødelegge nevroner (Olney 1986). Som nevnt er toksisitet fra glutamat vist i flere nevrodegenerative sykdommer (bl.a. Parkinson og Alzheimer sykdom) men også i andre patologiske tilstander som epilepsi, trauma og hjerneslag (Hardingham 2009).

I tillegg til andre tilstander forskes det mye på hjerneslag, som er ansvarlig for cirka 10 % av dødsfallene i industrielle land og er den nest vanligste dødsårsaken globalt (Pendlebury et al. 2004). Rundt 1/3 av de som overlever blir fysisk funksjonshemmet og avhengig av hjelpemidler lenger enn ett år (MacDonald et al. 2000). Til nå finnes det ingen effektiv behandling bortsett fra rekombinant human vevsplasminogenaktivator (alteplase), gitt innen tre timer etter symptomstart (Green and Shuaib 2006).

De fleste hjerneslag er iskemiske. Det skyldes tilstopping av en arterie på grunn av trombe eller emboli, som fører til tap av blodtilførsel og energisubstrater som oksygen og glukose til det affiserte området (Green and Shuaib 2006). Det igjen vil føre til at ATP-syntesen stopper opp og dermed også prosesser som er avhengig av ATP.

En konsekvens av ATP tap er hemming av Na^+/K^+ -ATPase som forårsaker omfordeling av ioner og membrandepolarisering. Det resulterer i Ca^{2+} -økning i cytosol, glutamatfrigjøring (fra astrocytter, mikroglia og nevroner) og stimulering av reseptorer som AMPAR og NDMAR (Boulland og Levy 2005; Taoufik and Probert 2008).

Aktivering av reseptoren gir økt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ som initierer en rekke cytoplasmiske hendelser. Disse omfatter degradering av proteiner, aktivering av NOS og økt produksjon av frie radikaler. Mitokondriell dysfunksjon er også en av mekanismene som leder til celledød (figur 1.3).



Figur 1.3 Apoptotiske signalveier som aktiveres av overdreven NMDAR aktivitet. Kaskaden av trinn som fører til apoptose:

(1) NMDAR overaktivering og økt $[Ca^{2+}]_i$, (2) aktivering av p38-MAPK -mef2C (transkripsjonsfaktorer)-vei, (3) toksiske effekter av NO og ROS, (4) aktivering av apoptose-induserende enzymer, bl.a. kaspaser (Lipton 2004)

Iskemisk skade er ofte forbundet med tap av nevroner. Men den iskemiske skaden omfatter alle celler, inkludert astrocytter. Astrocytter er multifunksjonelle celler som regulerer forholdene rundt nevronene. Kontroll av vann- og ionehomeostasen, produksjon og opptak av glutamat, fjerning av avfallsprodukter og regulering av metabolisme er noen av oppgaver til astrocyttene.

Svikt i noen av funksjoner vil utgjøre en trussel for overlevelse av nevroner. Derfor indikeres det at ved for eksempel hjerneslag er noen av funksjonene tapt og dermed er nevroner ikke i stand til å overleve (Takano et al. 2009).

NCX spiller også en rolle i hjerneslag og eksitotoksisitet. I en hjerneslag-modell ble NCX, spesielt isoform NCX3, kløvet i rottehjerne under simulert hjerneslag; hvilket også skjer i nevroner som eksponeres til eksitotoksisk stress (Bano et al. 2005). Et Ca^{2+} -avhengig proteinkløyning enzym, calpain, er identifisert som hovedaktør.

Hemming av denne; ved å overuttrykke calpastatin (endogen inhibitorisk protein til calpain), eller å uttrykke en NCX isoform som ikke er kløvet av calpain, hindrer Ca^{2+} -overbelastning og redder nevroner fra eksitotoksisk død (Bano et al. 2005).

Likevel kan man ut ifra disse resultater ikke konkludere at NCX kløving alltid fremmer celledød. Glutamateksponering øker både $[Na^+]_i$ og $[Ca^{2+}]_i$, hvor i Na^+ -ladete og depolariserte celler kan NCX gå i revers modus; det vil si føre til Na^+ -utdrivelse og Ca^{2+} -innstrømning som potencierer celledød (Besancon et al. 2008). I en slik situasjon er det mulig at NCX kløving motvirker denne toksiske prosessen.

Kalsiuminfluks er essensiell i glutamateksitotoksisitet (Choi 1985).

Glutamateksitotoksisitet i nevronale kulturer ble potensert i en Ca^{2+} -rik ekstracellulær løsning hvor en Ca^{2+} -fri løsning reduserte nevrodegenerasjon. NMDAR er involvert i denne Ca^{2+} -influksen (Choi 1987), men det finnes indikasjoner at veien av Ca^{2+} -innstrømningen og ikke bare Ca^{2+} -belastningen er viktig i NMDAR mediert nevrodegenerasjon (Tymianski et al. 1993).

Det finnes studier i kortikale nerveceller som tyder på at man kan få høyere dødelighet av nevroner med lavere Ca^{2+} -influks via NMDAR sammenlignet med høyere Ca^{2+} -influks via andre Ca^{2+} -kanaler (Sattler et al. 1998).

Andre studier påpeker at ved glutamateksitotoksisitet er det meste av intracellulær Ca^{2+} trukket inn i mitokondriene (Wang and Thayer 1996). Dette kan føre til for eksempel metabolsk acidose (Lau and Tymianski 2010) og åpning av PTP (mitochondrial permeability transition pore) på grunn av høy Ca^{2+} . Ca^{2+} -ionene strømmer inn i mitokondrien og det resulterer i svelling av organellen og frigjøring av proteiner som cytokrom c (cyt c) og apoptose induserende faktor (AIF) (Brown 2010). Disse igjen vil føre til apoptose.

Et annet kjennetegn ved eksitotoksisitet er en høy produksjon av NO. NO medierer flere effekter. For eksempel reagerer NO, som genereres fra NOS, med superoksidanion, O_2^- , (et radikal, ROS, dannet i mitokondriene) og danner peroksynitritt, et mye reaktivt og toksisk molekyl (Taoufik and Probert 2008; Lipton 2004). Celledøden (*in vitro*) kunne hindres med hemmere av NOS (Dawson et al. 1991).

Nyere studier (Hara et al. 2005) viser at NO interagerer med GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) som resulterer i nevrodegenerasjon via translokasjon til kjernen og aktivering av proteiner som medierer apoptose.

Det ble også nylig vist at en annen kanal i plasmamembranen, kalt for VSOR (volume – sensitive outwardly rectifying anion channel) er involvert i mange fysiologiske prosesser (volumregulering, apoptose) men også i en del patofysiologiske prosesser som skjer under iskemi, iskemi-reperfusjon og eksitotoksisitet (Okada et al. 2009). Tross påviste effekter er mye fortsatt uvisst; for eksempel hvordan cellen ”sanser” volumendringer og aktiverer VSOR.

1.4 Apoptose og nekrose

Apoptose, også kalt for programmert celledød (innebygd mekanisme til selvødeleggelse) ble først beskrevet i 1972 (Kerr et al. 1972). Kjennetegnene ved apoptose er kjerne- og cytoplasmakondensasjon i tillegg til fragmentering av DNA. Fragmentene pakkes inn i membranfragmenter og fjernes av fagocytter (Mattson and Bazan 2006). Dette hindrer at celleinnholdet lekker ut og andre celler skades. Apoptose er en aktiv prosess (krever ATP) som er viktig i fosterutvikling og for opprettholdelse av homeostasen i kroppen (dannelse av organer, utvikling av ervervet immunsystem). Mens apoptose er en langsom prosess, vil akutt skade i cellen føre til at denne går i nekrose. Nekrose er en passiv prosess som kjennetegnes av at cellen sveller og sprekker, slik at intracellulær materiale frigjøres og kan trigge en inflammatorisk reaksjon (Rang et al. 2003; Leist and Nicotera 1998).

Ved apoptose er kaspaser viktige intracellulære aktører. De kontrollerer celledødsprosessen ved bl.a. inaktivering av forskjellige proteiner som finnes både i cytoplasma, plasmamembranen men også i kjernen. Ved nekrose derimot er kalpainer og proteaser hovedaktører (Mattson and Bazan 2006).

Mange typer stimuli kan indusere apoptose og nekrose, som frie radikaler og ioninfluks (se forrige avsnitt). Begge typer forekommer i nevrodegenerative sykdommer men også i akutte tilstander som hjerneslag.

Forskjell mellom apoptose og nekrose som prosesser resulterende i nevrodegenerasjon er ikke absolutt, fordi fenomener som eksitotoksisitet og oksidativ stress kan være nok til å drepe celler ved nekrose, eller dersom disse er mindre intense kan de indusere cellene til å gå i apoptose (Mattson and Bazan 2006).

1.5 Cellelinjen SH-SY5Y

SK-N-SH er en human nevroblastom som ble isolert i 1970 fra en beinmargmetastase til en fire år gammel jente (Biedler et al. 1973). Denne cellelinjen inneholder to morfologisk distinkte celletyper, hvor den ene er av epiteltypen og den andre er nevroblastom.

Nevroblastom SH-SY5Y ble klonet fra SK-N-SH i 1978 (Biedler et al. 1978) og har siden da vært en nyttig modell innen forskning på nerveceller.

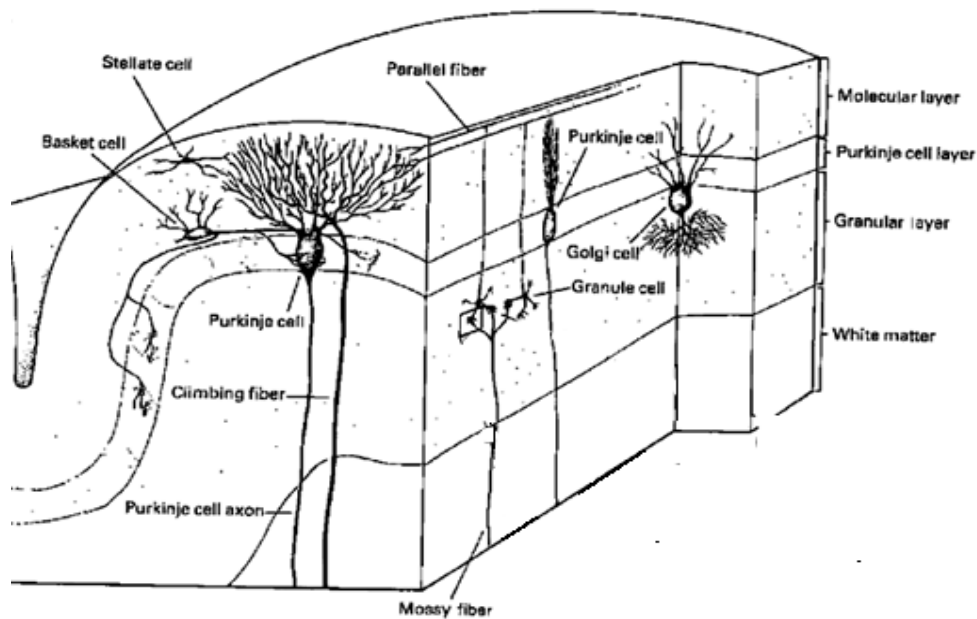
SH-SY5Y uttrykker ikke NMDAR (Wang et al. 2002), men flere andre viktige reseptorer som muskarine og nikotine acetylkolin reseptorer (nAChRs), (Lambert et al. 1989; Lukas et al. 1993) og L- og N-type Ca^{2+} -VOC (Lambert et al. 1992).

1.6 Granulærceller

Lillehjernen (latin: cerebellum) spiller en viktig rolle i kontroll av bevegelse og læring av motoriske ferdigheter. Den utgjør bare 10 % av det totale volumet av hjernen, men inneholder mer enn halvparten av alle nevroner (Ghez 1991).

Lillehjernen består av grå substans (ytre lag kalt cerebellær cortex) og hvit substans (gliaceller). Cerebellær cortex består av tre lag (molekylærlaget, purkinjecellelaget og granulærcelelaget) som inneholder fem typer nevroner: stjerneceller, kurvceller, golgiceller, purkinjeceller og granulærceller (figur 1.4). Bortsett fra granulærcellene som er eksitatoriske og bruker glutamat som nevrotransmitter, er de andre cellene inhibitoriske, hvilke bruker GABA som nevrotransmitter (Llinas et al. 2004).

Her fokuseres det på granulærcellene, da disse ble anvendt som modell i denne studien.



Figur 1.4 Illustrasjon av cerebellær cortex med sine tre lag, typer nevroner og fibre. For mer forklaring, se tekst (Ghez 1991).

Molekylærlaget som befinner seg ytterst, inneholder aksonene til granulærcellene, men det er det innerste laget, granulærcelelaget som inneholder stor antall av tettpakkede små nevroner (10 μm i diameter), også kalt for kornceller (granula=korn). Cirka 10^{11} granulærceller finnes og dette overstiger det totale celleantall i cerebral cortex (Ghez 1991).

Fordelene ved å bruke en *in vitro* modell av granulærceller i kultur for å studere forskjellige mekanismer (for eksempel nevrodegenerasjon) er at kulturmediet lett kan påvirkes/manipuleres. Ulempen er at cellene ikke er organisert i vev slik at det ikke finnes korrekte celle-celle interaksjoner og dermed kan de ikke motta stimuli fra andre celler. Man ønsker at granulærcellene utsettes for lignende stimuli som den fysiologiske *in vivo* (Gallo et al. 1982). Nerveceller som ikke utsettes for stimuli vil dø, da de trenger aktivitet for å overleve. Det bør også bemerkes at en signifikant andel av cellene fortsatt er under delingsfasen under dyrkningen. Derfor blir det i dyrkningsmediet bl.a. tilsatt 25 mM K^+ som resulterer i liten økning av Ca^{2+} i cellen slik at denne opplever det som aktivitet.

Dyrkede granulærceller som modell for eksitotoksisitet

Cerebellære granulærceller i kultur (5-7 DIV) er en viktig modell for studier av nevrotoksisitet (Frandsen and Schousboe 1990; Marini et al. 1997; Jacobs et al. 2006; Hogberg et al. 2009). Det er derfor av interesse å karakterisere eksitotoksisk celledød i CGN fra rotte og et sentralt spørsmål er om toksisiteten er avhengig av Ca^{2+} -økning ved NMDA- mediert toksisitet. Det er ikke klarlagt til hvilken grad NMDA-indusert toksisitet i rCGN er avhengig av Ca^{2+} -overbelastning og til hvilken grad andre mekanismer avhengige av NMDAR-aktivisering, parallelt fører til celledød.

Granulærcellemodellen skiller seg fra for eksempel spinale eller kortikale cellekulturer i at rCGN ikke er lett eksiterbare da de ikke har spenningsaktiverte Na^{+} -kanaler og dermed ikke aksjonspotensialer. Det vil si, selv om rCGN ved 7DIV viser glutamaterg-indusert toksisitet, er de ikke spontant eksitatoriske og de glutamaterge responsene er mindre ("topp" på 300-500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sammenlignet med 1000-1500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i andre nevronkulturer) men mer stabile og langvarige enn i for eksempel spinale nevronkulturer.

Det har blitt vist (Tymianski et al. 1993) at i spinale nevroner fra mus (14-17 DIV) førte en langvarig (over 80 min) eksponering av glutamat til en irreversibel forstyrrelse i Ca^{2+} -regulering og celledød. Man foreslo at toksisiteten var avhengig av NMDA-indusert Ca^{2+} -influx. Senere har samme gruppen forskere lagt mer fokus på andre NMDAR-avhengige toksiske mekanismer; kobling til PDZ-domenet og PSD95 (Aarts and Tymianski 2004).

Nylig ble det foreslått (Tu et al. 2010) at NR2B-subenhenten er involvert i celledød via en binding av et protein, DAPK1 ("death-associated protein kinase 1") til NR2B-subenhets C-terminal som fører til en økning av ionekanalens Ca^{2+} -permeabilitet, hvilket igjen fører til toksisitet. Disse studiene ble gjennomført i hippokampale nevroner. Celledød kan være modellavhengig, og i rCGN er det ikke klart til hvilken grad NMDA-stimulert toksisitet er avhengig av samtidig Ca^{2+} -overbelastning i cytosol og om toksisiteten er avhengig av Ca^{2+} -influx gjennom NMDAR. Det er heller ikke vist at NMDA og glutamat gir celledød på samme måte. Det er spesielt interessant ettersom $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -responser til NMDA i rCGN er mindre enn i andre cellekulturer.

NMDAR kolokaliserer med andre enzymer og det er mulig at NMDAR-aktivering samtidig med en høy Ca^{2+} lokalisert ved cellemembranen gir aktivering av mekanismer som fører til celledød, men at Ca^{2+} -influx gjennom NMDAR ikke er en kritisk komponent i dette.

1.7 Målsettinger

- Å finne passende stimulasjons- og inkubasjonsparametre for induksjon av NMDA-avhengig celledød, for eksempel NMDA/ glutamat/ kainat-konsentrasjoner, eksponeringstid, Ca^{2+} -konsentrasjon og påvirkning av oksygen og glukose.
- Å karakterisere den intracellulære Ca^{2+} -økningen i cerebellære granulærceller ved de toksiske nivåene av glutamaterg-indusert toksisitet.
- Å karakterisere den cytosoliske Ca^{2+} -økningen ved alternative stimuli som ikke er avhengige av NMDA-reseptor (NMDAR)-mediert Ca^{2+} -influx, gjennom å modulere ”på”- og ”av”-mekanismer for cytosolisk Ca^{2+} -regulering.
- Å vurdere cytosoliske Ca^{2+} -nivåer som gir Ca^{2+} -overbelastning.
- Sammenligne toksisitet ved de alternative influxveiene med celledød fra Ca^{2+} -influx via NMDAR og vurdere om NMDAR-mediert celledød oppnås ved Ca^{2+} -nivåer som er sammenlignbare med Ca^{2+} -overbelastning, det vil si om toksisitet ved NMDA-aktivering fås ved samme Ca^{2+} -konsentrasjon som toksisitet fra Ca^{2+} -overbelastning via alternative influxveier hvor NMDAR *ikke* er aktivert.
- Å etablere metoder og protokoll for å vurdere om man kan inhibere den glutamaterg-avhengige toksisiteten (eksitotoksisiteten) gjennom å blokkere Ca^{2+} -influx via en aktivert NMDAR, eller om en *aktivert* NMDAR gir toksisitet, bare Ca^{2+} er høy nok (det vil si selv under nivåer for Ca^{2+} -overbelastning) ved NMDAR i cytosol.

2 METODER OG MATERIALER

2.1 Kjemikalier

<i>Navn</i>	<i>Leverandør</i>
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
APV (D-2-amino-phosphono-pentanoic acid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ARA-C (Cytosine β -D-Arabinofuranoside)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Basal Medium Eagle (BME)	Invitrogen, Gibco, Auckland, New Zealand
BayK 8644	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bovint serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CE (carboxyeosin diacetate)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CPA (cyclopiazonic acid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DCKA (5,7-dichlorokynurenin acid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Deoksyribosenuklease I (DNase I)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fura-2/AM (Fura-2-acetoxymethyl)	Molecular probes, Eugene, Oregon, USA
Føtalt bovint serum (FBS), varmeinaktivert	Invitrogen, Gibco, Auckland, New Zealand
Gacyclidin (GK 11)	gave fra Beaufour Ipsen, Paris, Frankrike
Glutamat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glutamax	Invitrogen, Gibco, Auckland, New Zealand
Glysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ionomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kainat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Minimum Essential Medium (MEM)	Invitrogen, Gibco, Auckland, New Zealand
MK-801 (dizoclipine)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumvanadat (NaV)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nikotinamid adenin dinukleotid (NADH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

NMDA (N-methyl-D-aspartic acid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ouabain	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pluronic F-1270	Molecular probes, Eugene, Oregon, USA
Poly-D-lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Poly-L-lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Probenecid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Procyclidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Pyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
SBFI/AM (sodium-binding benzofuran isophthalate-acetoxymethyl)	Molecular probes, Eugene, Oregon, USA
Streptomycin/penicillin løsning (10000 IU/ml)	Invitrogen, Gibco, Auckland, New Zealand
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris HCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin inhibitor (SBT1)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Verapamil	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Alle andre stoffer ble levert fra kommersielle forhandlere.

2.2 Tillaging av cerebellære graunlærceller

2.2.1 Løsninger for preparering av cerebellære granulærceller

10 x Krebs Ringer Løsning:

NaCl	35,35 g
KCl	1,80 g
KH ₂ PO ₄	0,83 g
Glukose	12,85 g
NaHCO ₃	10,70 g
fenolrødt	50 mg
H ₂ O (destillert)	ad 500ml

Løsning 1:	BSA	0,3 g
	Krebs Ringer	10 ml
	MgSO ₄	800 µl
	H ₂ O (destillert)	ad 100 ml

Løsning 2:	trypsin	5 mg
	løsning 1	20 ml

Løsning 3:	DNase	1,25 mg
	SBT1	5,2 mg
	løsning 1	10 ml

Løsning 4:	løsning 3	3,2 ml
	løsning 1	20 ml

Alle løsninger ble sterilfiltrert gjennom et 0,22 µm filter over i sterile beholdere.

2.2.2 Dyr

Lillehjernen fra 6-7 dager gamle Wistar rotter og NMRI-mus ble brukt.

Disse ble levert sammen med ammen fra laboratorier i Danmark. Dyrene ble levert på dyrestallen på FFI samme dag som de skulle avlives.

Alle forsøk ble utført i henhold til lover og forskrifter og etter godkjenning fra ansvarshavende.

2.2.3 Autoklaving

Disseksjonsutstyr ble pakket inn i aluminiumsfolie og autoklavert ved 120 °C i 20 minutter. Annet utstyr som flasker ble også autoklavert.

2.2.4 Preparering av brett og dekkglass

Dagen før cellekulturene ble laget, ble brett (96-brønn (Corning CellBind[®], Corning, NY, USA) og 24-brønn (NUNC, Roskilde, Danmark)) preparert med poly-L-lysin. 5 mg poly-L-lysin ble tilsatt til 500 ml destillert vann (sluttkonsentrasjon 0,01mg/ml) og forskjellige mengder ble tilsatt til platene. Løsningen ble fjernet etter 30-60 minutter. Platene ble stående i en LAF-benk (Kojair, Kojair Tech Oy, Vilppula, Finland) til neste dag.

Preparering av glass til kornceller

Dekkglass ble preparert på forhånd, før cellekulturen ble laget. 12 glass (borosilikat, ø 18mm) (Menzel, Tyskland) ble rensset med 10-20 % Deconex i 10-30 minutter i 80 °C og deretter vasket med vann. Glassene ble lagt inn i en teflonholder som ble satt i et 200 ml begerglass. 100 ml sterilt vann, 2 µl 98 % eddiksyre og 0,5 ml silan (3-glycidoxypropyl trimethoxy silan 98 %) ble tilsatt til begerglasset. Dette ble satt til svak røring over natt. Neste dag ble teflonholderen tørket med papir, lagt i tørkeskap i 20 minutter ved 112 °C og deretter avkjølt i 3-4 minutter.

100 ml sterilt vann, 3 ml natriumborat og 1 ml poly-D-lysin 10 mg/ml, (sluttkonsentrasjon 0,1 mg/ml) ble tilsatt begerglasset. Dette ble satt til svak røring over natten.

Dagen etterpå ble teflonholderen tørket med papir og satt i tørkeskap i 60 minutter ved 37 °C til alle glassene var tørre.

I LAF-Benk ble glassene overført til en 12- brønners brett (CoStar Falcon, Becton Dickinson, VWR). Bunnen til platen ble skrapet opp før glassene ble lagt i, slik at glass ikke ble festet i bunnen av platen. Glassene ble deretter behandlet med UV-lys i 20 minutter for sterilisering.

2.2.5 Tillaging av cellekulturmedium

Rotte

50 ml medium tas ut av en 500 ml flaske med BME. 500 mg glukose og 825 mg KCl løses opp i litt medium og sterilfiltreres (0,22 µm filter) tilbake til mediet.

5 ml Glutamax, 5 ml penicillin/streptomycin (10000 IU/ml), 0,5 ml Amphotericin B og 50 ml FBS tilsettes.

Mus

50 ml medium tas ut av en 500 ml flaske med DMEM. 850 mg glukose og 710 mg KCl løses opp i litt medium og sterilfiltreres (0,22 µm filter) tilbake til mediet.

2 ml insulin (1 mg/ml) tilsettes til blandingen i tillegg til 5ml Glutamax,

5 ml penicillin/streptomycin (10000 IU/ml), 0,5 ml Amphotericin B og 50 ml FBS.

2.2.6 Prosedyre for celledyrking

Cellekulturen ble laget etter prosedyren for granulærceller av Gallo et.al., 1982.

Arbeidet ble utført aseptisk i en LAF-benk.

- 6-7 dager gamle rotter/mus ble avlivet ved dekapitering med saks. Lillehjernen ble dissekert ut med pinsett og lagt på is i løsning 1. Det ble helt ut på en skål med en isblokk under.
- Hjernehinne og blodårer ble fjernet ved hjelp av pinsettene før hver lillehjernen ble overført til en ny skål med løsning 1. Lillehjernen ble kuttet opp i små biter med en skalpell og overført til et sterilt rør hvor deretter det ble sentrifugert i ett minutt ved 1000 rpm (IEC centra CL2, International Equipment Company, Tamro LAB, Vantaa, Finland).
- Supernatanten ble fjernet og pelleten resuspendert i løsning 2. Dette ble helt over på en steril trypsineringsflaske som ble satt på ristebad (M20S LAUDA) ved 37 °C i 15 minutter.
- Innholdet i flasken ble overført med en pipette til et sterilt rør og tilsatt løsning 4. Dette ble sentrifugert i ett minutt ved 1000 rpm.
- Supernatanten ble fjernet og et par ml av løsning 3 ble tilsatt. Pelleten ble løst opp med pasteurpipetter til man fikk en homogen blanding. Oppvarmet medium ble tilsatt cellene og røret ble sentrifugert ved 1000 rpm i 7 minutter.
- Supernatanten ble fjernet og 1-2 ml medium ble tilsatt til røret, suspendert og overført til flasken med medium. 12 ml medium ble brukt per lillehjernen. Cellene ble blandet godt med medium og overført til brett.
- Cellene ble inkubert ved 36 °C og 6 % CO₂ (Forma Scientific CO₂ water jacketed incubator, Forma Scientific inc., Ohio, USA).
- Dagen etter (16-18 timer etter inkubering) ble det tilsatt ARA-C. 1mg ARA-C ble løst i 10 ml ferdig preparert BME og sterilfiltrert (0,22 µm filter). Løsningen ble tilsatt cellene til en sluttkonsentrasjon på 10 µM. ARA-C inhiberer celleproliferasjon.

Forsøk på cellene ble kjørt 5-7 dager etter inkubasjon.

2.3 Dyrking av SH-SY5Y cellelinje

Medium:

Bruker Minimum Essential Medium (MEM) med glutamax:

50 ml medium ble tatt ut fra en flaske på 500 ml og flasken ble tilsatt:

- 50 ml FBS (føtalt kalveserum), varmeinaktivert
- 5 ml PS (penicillin og streptomycin)

Flasker og brett (96-brønn):

Flasker av ulik størrelse og brett ble behandlet med poly-L-lysin (se avsnitt 2.2.4).

SH-SY5Y (The European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) ble oppbevart i små ampuller (1 ml kryorør) i fryseren ved -135 °C i medium med 20 % serum og 10 % DMSO. Før dyrking av cellene, ble ampullen varmet opp til 37 °C i vannbad. Deretter ble cellesuspensjon tilsatt til ferdiglaget medium og overført til 96-brønners brett og en 75 ml flaske. Cellene ble dyrket i inkubatorskap ved 36 °C, 6 % CO₂ og luft mettet med vann.

Dagen etterpå ble det skiftet medium for å fjerne rester av DMSO. Medium ble byttet etter tre til fire dager.

"Splitting" (deling av cellekulturen til nye flasker):

Gjøres en til to ganger i uken. Medium i flasken ble fjernet og cellene vasket med 2 ml EDTA-løsning før 1 ml EDTA-løsning ble tilsatt. Flasken ble satt i inkubatorskap i et par minutter. 10 ml av medium ble tilsatt cellene og suspensjonen ble sentrifugert i tre minutter ved 1000 rpm. Deretter ble supernatanten fjernet og cellene resuspendert i 5 ml medium. For videre dyrking ble cellesuspensjon tilsatt til mediet og overført til en ny flaske og nye brett.

Dagen etter "splitting" ble mediet byttet for å fjerne døde celler.

Forsøk ble utført på celler fra generasjon 19-24.

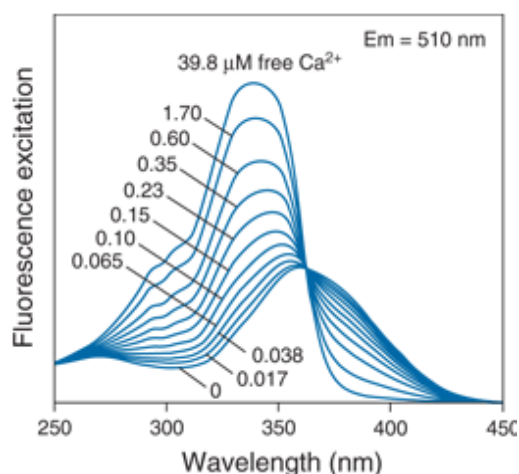
2.4 Måling av intracellulær Ca^{2+}

Siden det er kjent at Ca^{2+} er involvert i nevrotoksisitet, ble det testet teknikker for å måle Ca^{2+} i granulær celler. En av metodene er måling med fluoriserende Ca^{2+} -indikatorer (Nuccitelli 1994). Disse er chelatorer som bindes til Ca^{2+} -ioner. Den mest kjente ratiometriske indikatoren er fura-2.

Fura-2 blir tilsatt til cellene i form av en ester, fura-2/AM. Fura-2 er et hydrofilt molekyl og vil derfor ikke lett kunne krysse plasmamembranen og diffundere inn i cellen. Som en ester (fura-2/AM), er den hydrofob og vil dermed lett passere denne. Karboksylgruppene i indikatoren er viktige for å kunne binde Ca^{2+} , derfor er det nødvendig at estergruppene fjernes når molekylet har kommet inn i cellen. Dette skjer ved hjelp av uspesifikke esteraser som hydrolyserer estergruppene (Kao 1994). Siden det er høy konsentrasjon av fura-2 i cellen, vil den kunne krysse intracellulære membraner til organeller som mitokondrier, ER og SR. Dette kan resultere i forstyrrelse i fluorescensmålinger av cytoplasmisk Ca^{2+} .

Fordelen med ratiometriske indikatorer er at målinger ikke blir påvirket av faktorer som tykkelse på cellevegger eller ujevn ladning av fura-2. Det betyr at selv om indikatoren lekker ut, vil intensiteten til fluorescensen gå ned, men forholdet mellom intensiteten av fluorescensen ved de to bølgelengdene (F340/F380) blir det samme (Grynkiewicz et al. 1985).

Fritt og bundet fura-2 har ulik UV-spekter og derfor kan man bestråle proben med ulike bølgelengder for så å måle emisjonen ved 510 nm (figur 2.1).



Figur 2.1 Eksitasjonsspekter til fura-2 ved forskjellige bølgelengder og ulike mengder fritt Ca^{2+} (Inivitrogen 2010)

Når fura-2 eksiteres ved 340 nm øker fluorescensintensiteten med økende $[\text{Ca}^{2+}]$; eksitasjon ved 380 nm vil da minske. Dette vil gi en høy F_{340}/F_{380} ratio, som gir grunnlag for å beregne $[\text{Ca}^{2+}]$. Det kan gjøres ved hjelp av Grynkiewicz likning:

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \times (S_{f2}) / (S_{b2})$$

K_d er dissosiasjonskonstanten for fura-2, R (ratio) er forholdet mellom intensiteten av fluorescensen ved de to bølgelengdene, R_{\min} er verdien til R når fura-2 er på den Ca^{2+} -frie formen, R_{\max} er den verdien til R når indikatoren er mettet med Ca^{2+} . S_{f2} / S_{b2} er ratioen mellom fluorescensen ved 380 eksitasjon for den Ca^{2+} -frie og den Ca^{2+} -bundne formen (Grynkiewicz et al. 1985).

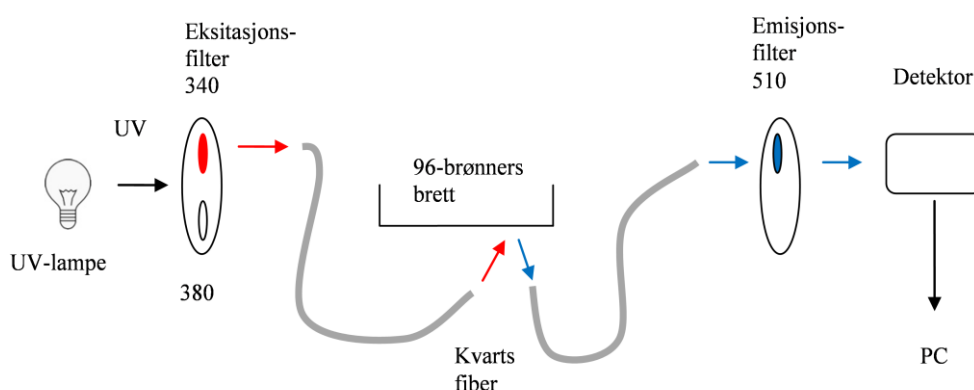
2.4.1 Plateleser

De fleste forsøk ble utført med BMG FluoStar Optima plateleser (BMG FluoStar Optima, BMG labtech, Offenburg, Tyskland)

Den er styrt med en datamaskin, og har to injektorer som kan fylles med forskjellige forsøksløsninger. Målingene av 96-brønners brett var automatiserte.

Plateleseren fungerer slik at lys fra en UV-lampe sendes gjennom et eksitasjonsfilter til en brønn i brettet inne i leseren.

Emittert lys blir sendt tilbake til et filter og en detektor som sender et elektrisk signal videre til datamaskinen hvor det kan avleses (figur 2.2).



Figur 2.2 Skisse av plateleserens funksjon

Prosedyre for forsøk med plateleser (kornceller / SH-SY5Y)

Kornceller og SH-SY5Y celler ble dyrket som tidligere beskrevet. All arbeid foregikk aseptisk i en LAF-benk. Fra en 96-brønners brett med CGN ble det overført 50 μ l fra hver brønn til en beholder og blandet med fura-2-DMSO løsningen (ferdiglaget, 50 μ g fura-2 løst i 50 μ l steril DMSO). Blandingen ble lagt tilbake til brettet (50 μ l til hver brønn) og inkubert i 45 minutter.

Samme prosedyre gjelder for SH-SY5Y men i tillegg til fura-2 og DMSO ble det tilsatt detergenten pluronic F-1270, 20 % og probenecid 2 mM. Dette for å øke cellulær opptak av proben i cytosolen (Kao 1994; DiVirgillo et al. 1990).

I tillegg ble det tilsatt 2 mM probenecid til alle andre løsninger som ble brukt i forsøket med SH-SY5Y celler.

Tabell 2.1 Sammensetning av buffere

mM	Standard buffer	Deesterif. buffer	Stimulasjons buffer **	K ⁺ -buffer	Rekonvalesens Buffer	Vaske-Buffer
Tris HCl	15	15	15	15	15	15
NaCl	140	140	140	95/110/118	120	140
KCl	3,5	3,5	3,5	50/35/22	25	3,5
NaH ₂ PO ₄	1,2	1,2	0	0/1,2	1,2	1,2
CaCl ₂ *	1,25	1,25	1-10	1-12	1,25	1,25
MgSO ₄	1	1	0	1	1	1
glukose	5	5	0/5	0/5	5	5

*Ved bruk av Ca²⁺-konsentrasjon over 3 mM, ble det ikke tilsatt fosfat (mulig utfelling).

**Et eksempel på stimulasjons buffer for NMDA er vist. Konsentrasjonene til stoffene kan variere, avhengig av hvilken stimulasjon som ble anvendt; ionomycin, PMCA-blokkering, Na⁺/K⁺-ATPase-blokkering, etc. Ved K⁺-stimulasjon ble 10 µM BayK 8644 inkludert i bufferen.

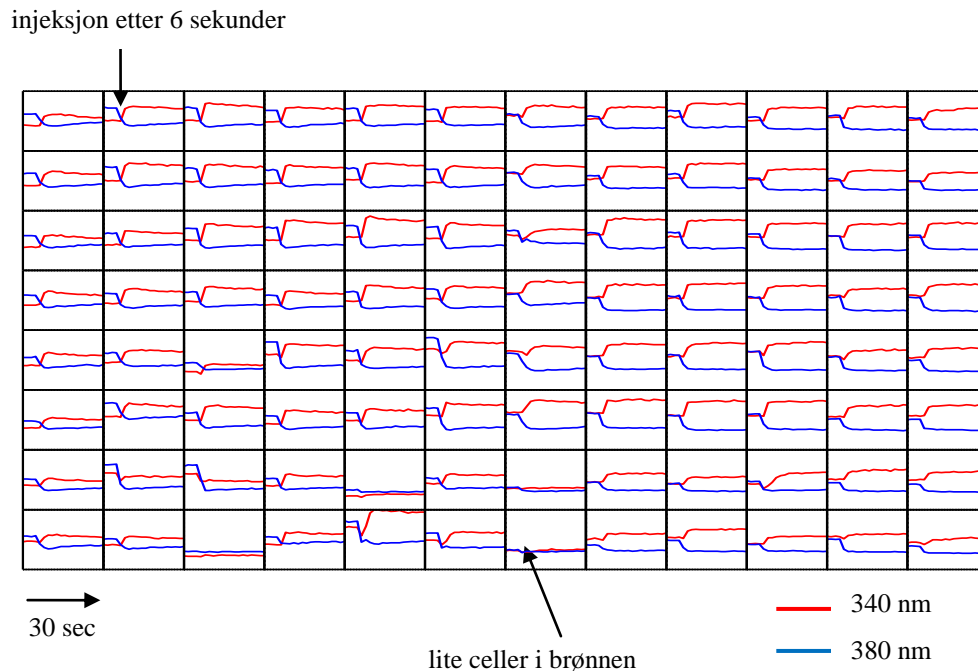
Deesterif. buffer = Deesterifiseringsbuffer

Etter inkubasjon ble ladningsmedium fjernet og tilsatt deesterifiseringsbuffer (100 µl/brønn), se tabell 2.1. Cellene ble deesterifisert i 30 minutter. Deretter ble cellene vasket med en vaskebuffer før stimulasjonsbuffer ble tilsatt (100-200µl/brønn). Brettet ble plassert i plateleseren. Målingstiden ble satt på 20 syklus (ca.30 minutter) og eventuelle injeksjonsløsninger ble injisert ved 5. syklus. Injeksjonsløsningene ble lagt inn i plateleseren på forhånd for å få riktig temperatur (32 °C).

Injeksjonshastighet var på 100-120 µl/s og injeksjonsvolumet varierte fra forsøk til forsøk.

Plateleseren kunne stilles inn i forskjellige moduser, ”plate mode” og ”well mode”. For forsøk i ”plate mode” ble det først målt i en brønn (og eventuelt injisert løsninger) også ble det umiddelbart gått over til neste brønn. Dette ga mulighet for å kunne se på lengre responser. En ulempe med denne er at det går lang tid mellom hver måling i hver brønn. I ”well mode” ble en og en brønn tilsatt løsning og gjort forsøk på om gangen (maks 30 sekunder per brønn). Dermed kunne man kun se korte og umiddelbare responser.

Et eksempel på hvordan rådata ser ut etter kjøring av 96-brønners brett i "well mode" er vist i figur 2.3.



Figur 2.3 Rådata for $[Ca^{2+}]_i$ responser fra rCGN i et 96-brønners brett. Den røde linjen viser fluorescens ved 340 nm eksitasjon (F340) og den blå linjen viser fluorescens ved 380 nm (F380). X-aksen viser tiden i sekunder mens y-aksen intensiteten (økende) i fluorescens. Økning i F340 og reduksjon i F380 indikerer en økt $[Ca^{2+}]_i$ respons. Kryssing av linjene indikerer injeksjon av løsning (i dette tilfellet 50mM K^+) etter 6 sekunder som viser økt Ca^{2+} .

2.4.2 Enkeltcelle imaging

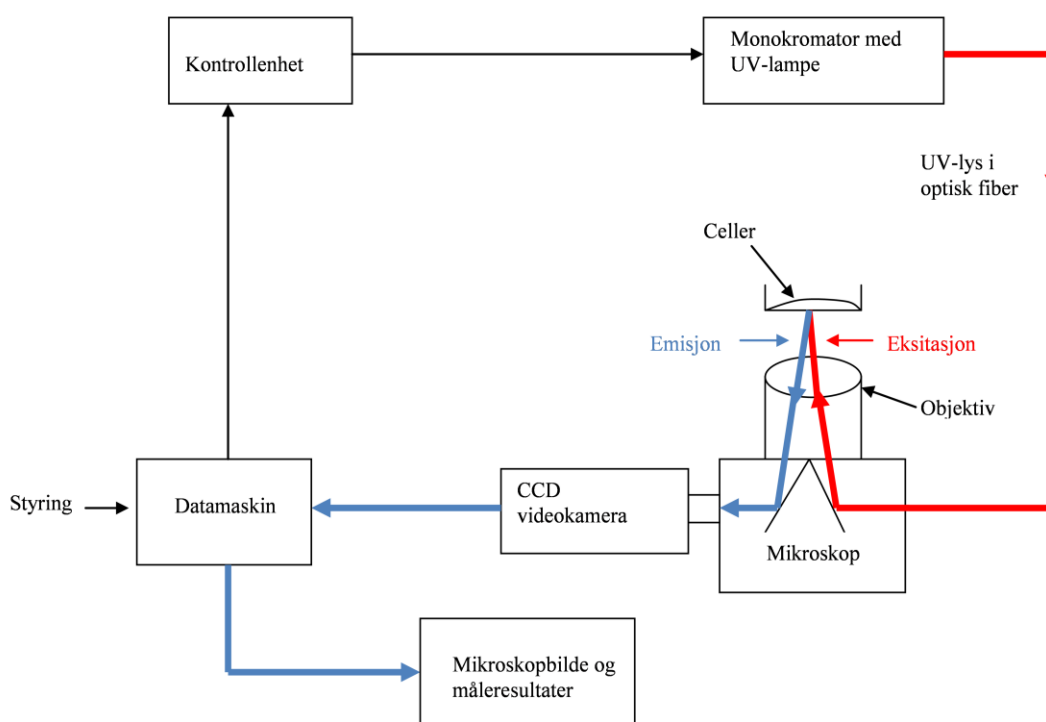
Imaging teknikk ble benyttet for å bestemme Ca^{2+} -konsentrasjonen intracellulært. Mikroskopet er selve hjertet i systemet (Olympus IX 70). Datamaskinen styrer en kontrollenhet hvilket styrer en monokromator (Polychrome II, TILL-Photonics). Monokromatoren har en UV-lampe med speil som blir flyttet av en digitalstyrt motor, dermed kan den vekselvis sende ut bølgelengder, i vår tilfelle 340 nm og 380 nm. I tillegg til dette har monokromatoren et interferensfilter som sprer UV-lyset som et

prisme. Lyset blir sendt inn i mikroskopet via en optisk fiber. Der treffer lyset cellene som ligger under mikroskopet.

Mikroskopet er koblet til et CCD- (charged coupled device) videokamera (Imago, advanced cooled imaging, TILL-Photonics) som sender emisjonsbilder til datamaskinen.

Emisjonsfilter som sitter i mikroskopet slipper gjennom kun bølgelengder som er mer enn 500 nm til kameraet. Når det ble kjørt eksperimenter kunne man se forskjeller i Ca^{2+} -konsentrasjonen gjennom å se på ratioen F340/F380 for fura-2.

Oppsettet er vist i figuren under.



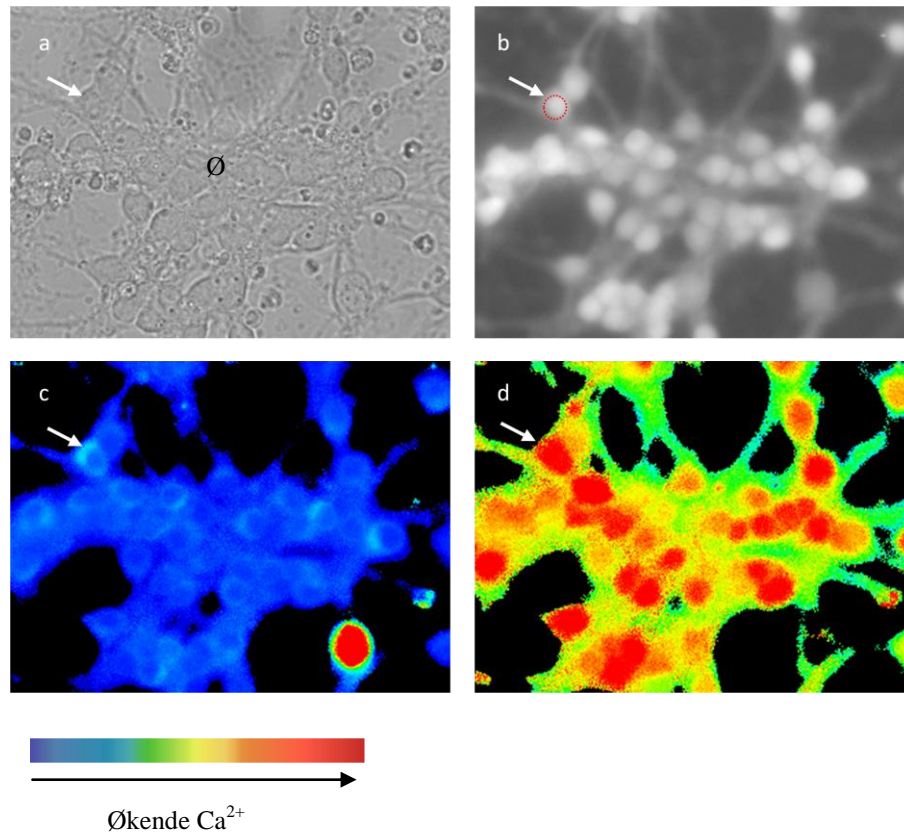
Figur 2.4 Oppsett av Ca^{2+} imaging systemet

Prosedyre for forsøk med imaging

Celler for forsøk med imaging ble dyrket på glass i 12-brønners brett. På forsøksdagen ble cellene ladet med blandingen av fura-2 og DMSO (50 μg /50 μl DMSO, ferdiglaget). 3 μl av blandingen ble tilsatt til hver brønn med glass og inkubert i 45 minutter. Deretter ble glasset med cellene tatt ut av brønnen og satt i et eget kammer.

Deesterifiseringsbuffer ble tilsatt (500 μl) og dette lå mørkt i 30 minutter.

Etter en halv time ble cellene vasket med standard buffer og tilsatt 500 μl standard buffer. Kammeret ble satt på plass i mikroskopet. Eksperimentløsning ble tilsatt manuelt under forsøket. Et eksempel på hvordan cellene ser ut i mikroskopet er vist i figur 2.5.



Figur 2.5 (a) Transmisjonsbilde (40 X objektiv) av sju dager gamle granulærcellers fordeling på dekkglasset. (b) UV/fluorescens-bilde av (a), hvor cellene har blitt eksitert ved 380 nm. (c) Ved bruk av UV-lys visualiseres den intracellulære Ca^{2+} -økningen. Her er Ca^{2+} -konsentrasjonen lav, da cellene ikke har blitt stimulert. (d) Viser cellene under stimulering, hvor rødt indikerer høy Ca^{2+} konsentrasjon. Grønne og gule regioner er celleområder med mindre Ca^{2+} -respons. Pilene henviser til samme cellen i a-d.

2.5 Måling av intracellulær Na^+

For å kunne måle intracellulær Na^+ ble det benyttet den mest anvendte Na^+ -sensitive proben, SBFI (sodium-binding benzofuran isophthalate), i form av en ester (Minta and Tsien 1989).

Prosedyre for ladning av cellene

Kornceller ble dyrket som tidligere beskrevet. All arbeid foregikk aseptisk i en LAF-benk.

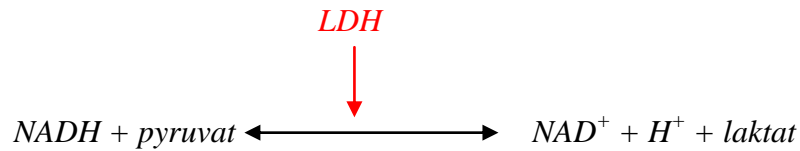
Fra en 96-brønners brett med CGN ble det overført 50 μl fra hver brønn til en beholder. Til en ampulle med 50 μg SBFI ble det tilsatt 25 μl steril DMSO. Det ble blandet godt og 25 μl pluronic F-1270, 20 % ble tilsatt til blandingen. Blandingen ble overført til mediet i beholderen og 2 mM probenecid ble tilsatt og blandet med SBFI-løsningen. Blandingen ble lagt tilbake til brettet (50 μl til hver brønn) og inkubert i 60 minutter.

Etter inkubasjon gjelder den samme prosedyren som i avsnitt 2.4.1 (til alle løsninger ble det tilsatt 2 mM probenecid).

2.6 Måling av toksisitet

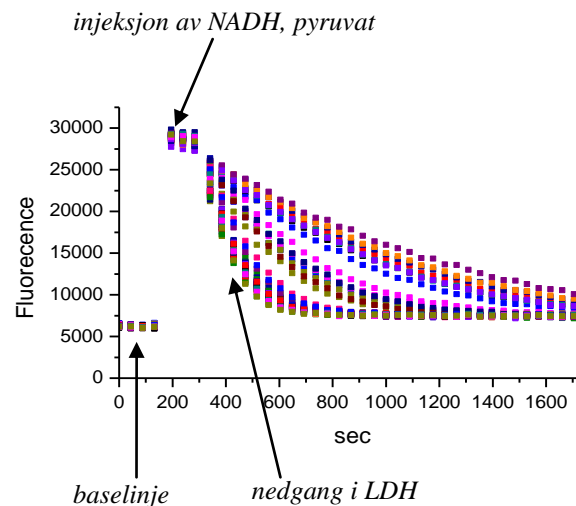
Laktat dehydrogenase (LDH) er et cytoplasmisk enzym som er til stede i alle celler og brukes som en markør for celledød. Plasmamembranen er normalt impermeabel for LDH, men skade i cellen kan resultere i en endring av membranpermeabilitet og påfølgende lekkasje av LDH ut i den ekstracellulære væsken (Koh and Choi 1987); det vil si dersom antall døde celler øker, øker også mengden LDH frigjort.

LDH omdanner pyruvat til laktat i nærvær av NADH (som fluoriserer), se likning under:



Metoden er basert på fluorometrisk måling av NADH konsentrasjonen ved eksitasjonsbølgelengden 340 nm i plateleseren (se avsnitt 2.4.1).

NADH og pyruvat ble injisert automatisk til 96-brønns brett, hvor deretter emisjonslyset ved 460 nm ble målt og vist som en kurve på datamaskinen. Dersom det er høy konsentrasjon av LDH i brønnene (høy celledød) vil hastigheten på nedgangen av NADH-fluorescensen være høy (figur 2.6) (Koh and Choi 1987).



Figur 2.6 Måling av LDH aktivitet. Toksisitetskurve med NADH og pyruvat injeksjon etter noen minutter er vist.

Hastigheten på nedgangen ble målt, som er et mål på antall døde celler; det betyr at fall på kurven er proporsjonal med toksisiteten.

Tallene er ikke enkelt relaterbare til mengde celledød; disse er arbitrære enheter som måles som fluorescensnedgang per tidsenhet. Det er vanskelig å relatere LDH-frisettingen over 24 timer direkte til celledød, men man kan sammenligne disse med måling av celledød og celleoverlevelse, ved hjelp av metoder som farging av cellene.

Ved slike studier har det tidligere blitt konstatert at en aktivitet på 100 motsvarer 70 % celledød. På grunn av usikkerheten i direkte kvantifisering av celledød med LDH-måling, er den mest brukbar ved sammenligning mellom ulike eksponeringer og kontroll i en og samme eksperiment.

2.6.1 LDH-frisetting

Løsninger ble laget på forhånd:

0,1 M KPO_4 buffer pH 7.5:

1.36 g KH_2PO_4 i 100 ml H_2O

4.56 g K_2HPO_4 i 200 ml H_2O

K_2HPO_4 tilsettes KH_2PO_4 til pH blir 7,5.

NADH 0,6 mg/ml: 6 mg løses i 10 ml KPO_4 buffer

pyruvat 6 mg/ml: 60 mg løses i 10 ml KPO_4 buffer

Dag1

Mediet i 24-brønners brett med CGN ble fjernet med sug hvor cellene deretter ble vasket med standard buffer. Ferdiglagede løsninger, som man ville undersøke toksisiteten til, ble tilsatt til brettet (250 μl /brønn). Brettet ble stående i romtemperatur i 30 minutter (cellene ble utsatt for stress). Deretter ble cellene vasket med standard buffer før det ble tilsatt rekonvalesens-buffer. Brettet ble inkubert i 36 °C over natt. 24 timer senere ble LDH målt.

Dag 2

113 µl av KPO₄-buffer ble tilsatt til 96-brønners brett. Deretter ble det overført 50 µl av prøven/mediet fra 24-brønners brett med kornceller til hver brønn (flere doser og paralleller). 12 µl pyruvat (6 mg/ml) og 25 µl NADH (0,6 mg/ml) ble injisert automatisk til brønnene av plateleseren, som på forhånd ble stilt inn på eksitasjon ved 340 nm, emisjon ved 460 nm og temperatur på 28 °C. Fluorescens ble målt i 28 minutter (38 syklus).

2.6.2 Oksygen og glukose deprivasjon (OGD)

Oksygen og glukose deprivasjon (OGD) blir ofte brukt som en *in vitro* iskemi/hjerneslag modell (Martínez-Sánchez et al. 2004). Det betyr at mest mulig glukose og oksygen fjernes fra cellene, for deretter å måle celledød ved hjelp av LDH-modellen.

Prosedyre for OGD

Dag 1

24-brønners brett og korncellene ble preparert som beskrevet tidligere i avsnitt 2.2.4 og 2.2.6

Før forsøket ble satt i gang, ble løsningene som skulle testes boblet med nitrogen (N₂) i 30 minutter. Imens ble det til brettet tilsatt 1 ml/brønn av standard buffer (se avsnitt 2.6.1) uten glukose som stod i 30 minutter i romtemperatur.

Standard buffer ble fjernet ved hjelp av sug, før forsøksløsningene ble tilsatt til brettet (500 µl/brønn). Brettet ble overført til en O₂-fri beholder, hvor N₂ ble tilført i noen minutter. Platen ble inkubert i en halv time, hvor cellene deretter ble vasket med rekonvalesens-buffer (se avsnitt 2.6.1). 250 µl/brønn av rekonvalesens-bufferen ble tilsatt og cellene ble inkubert i 36 °C over natt.

Dag 2

Samme prosedyre gjelder som i avsnitt 2.6.1 - dag 2.

2.7 Dataanalyse

Rådata ble analysert ved hjelp av programmet OriginPro 8.0. Grafer og diagrammer ble laget ved hjelp av Microsoft Office Excel 2007. Resultatene blir vist som gjennomsnitt \pm SEM. Med flere kurver i et plot, ble det bestemt at feilene (SEM) ikke skulle vises, da kurvene ville bli utydelige å lese.

Rådata (resultatene) fra plateleseren ble analysert slik at bakgrunn (målt før start av forsøk) ble subtrahert fra rådata. Ratio ble kalkulert ved å dividere intensiteten ved 340 nm med 380 nm. Deretter ble data overført til Excel hvor man beregnet gjennomsnitt og SEM av parallellene til dosene som det ble kjørt forsøk på.

For å sammenligne grupper ble t-test benyttet. Signifikans ble oppgitt med

*($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

Det ble satt en grense ("cut off") på 2000 nM i $[Ca^{2+}]_i$ respons, da fura-2 har en grense på 100-2000 nM, og responser over denne grensen var ikke pålitelige (Tymianski et al. 1993). SEM for $[Ca^{2+}]_i$ responser over 2000 nM ble ikke vist.

3 RESULTATER

En serie forsøk ble utført for å karakterisere intracellulær Ca^{2+} -konsentrasjon ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Målet var å øke $[\text{Ca}^{2+}]_i$ via andre veier (bl.a. ionomycin, K-depolarisering, Ca^{2+} -kanaler) enn gjennom NMDAR. Først ble forsøkene utført med enkeltcelle imaging ved hjelp av mikroskop og digitalkamera. Etter enkeltcelle imaging ble det benyttet en annen metode; Ca^{2+} -respons-måling med plateleser.

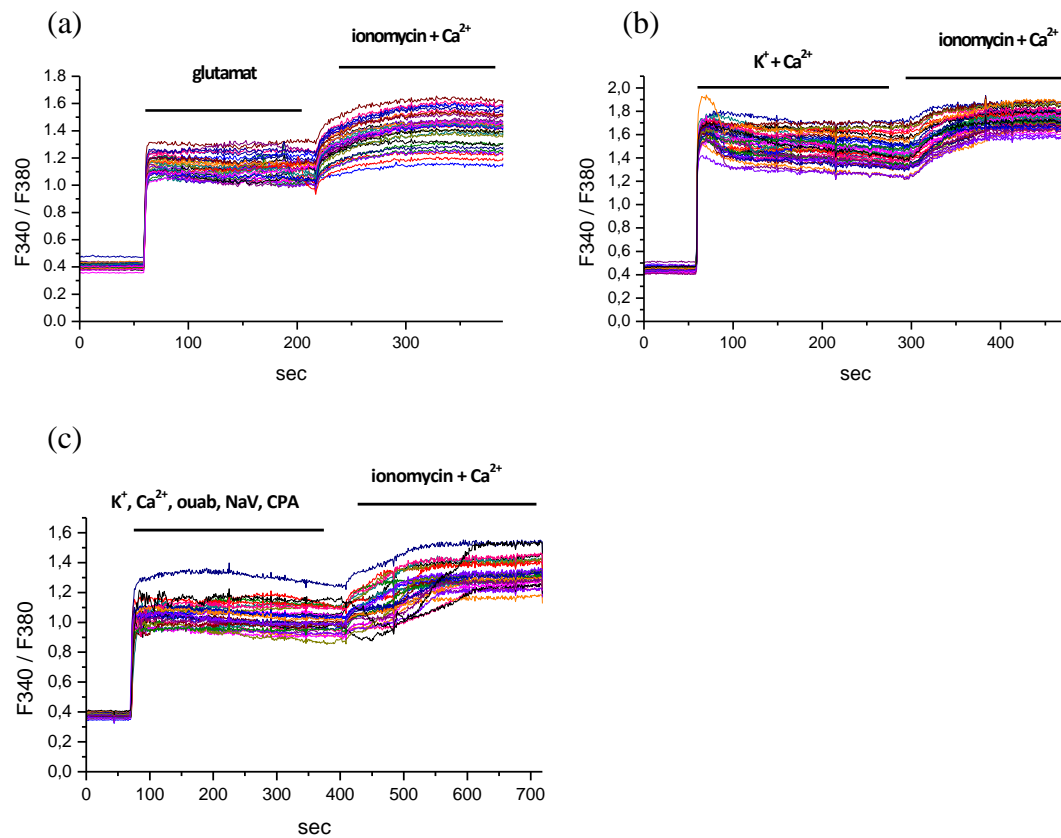
3.1 Enkeltcelle imaging

De første forsøkene ble utført med enkeltcelle imaging for å se om cellene var fungerende, og detaljene på hvordan disse responderte på ulike stimuli. Det ble prøvd å øke $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ved hjelp av forskjellige stoffer, for eksempel glutamat, ionomycin og kalium.

Figur 3.1a viser responsen av 500 μM glutamat, mens figur 3.1b viser responsen av 50 mM K^+ -depolarisering. Det var mulig å få økt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ med K^+ -depolarisering og BayK 8644 (potensierer HVA-kanaler) like høyt som med 500 μM glutamat når man samtidig blokkerte NMDAR med MK-801. Figurene viser at cellene responderer likt og stabilt.

Figur 3.1c viser at det ikke hjelper å stimulere Ca^{2+} -frigjøring fra intracellulære lagre (med CPA), samtidig som man blokkerer Na^+/K^+ -ATPasen og PMCA (med ouabain, NaV) for å øke Ca^{2+} -nivåer i cellen, sammenlignet med K^+ -depolarisering. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ var ikke så høy som forventet.

Etter forsøk med enkeltcelle imaging, ble det fortsatt med en mer effektiv metode hvor plateleseren ble benyttet (se diskusjon).



Figur 3.1 $[Ca^{2+}]_i$ i rCGN med enkeltcelle imaging, vist som ratio F_{340}/F_{380} , hvor hver linje indikerer ratioen fra en enkelt celle.

(a) $[Ca^{2+}]_i$ med 500 μM glutamat, med påfølgende stimulering med 8 μM ionomycin/10 mM Ca^{2+} .

(b) $[Ca^{2+}]_i$ økt med 50 mM K^+ og 10 mM Ca^{2+} (med 250 nM MK-801). Ytterligere stimulering med 8 μM ionomycin/10 mM Ca^{2+} .

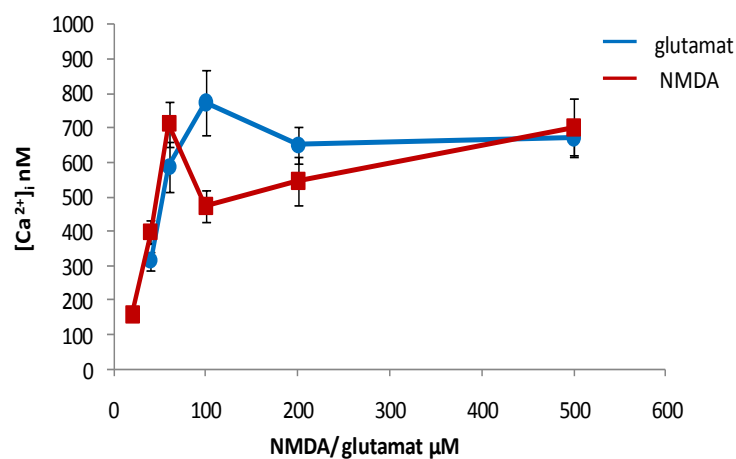
(c) $[Ca^{2+}]_i$ økt med kombinasjon av: 25 mM K^+ , 10 mM Ca^{2+} , 1 mM ouabain, 30 μM CPA, 1mM natriumvanadat (NaV). Ytterligere stimulering med 8 μM ionomycin/10 mM Ca^{2+} .

Alle stimulasjoner med K^+ var med kombinasjon av BayK 8644 10 μM .

3.2 Karakterisering av Ca^{2+} i cerebellære granulærceller

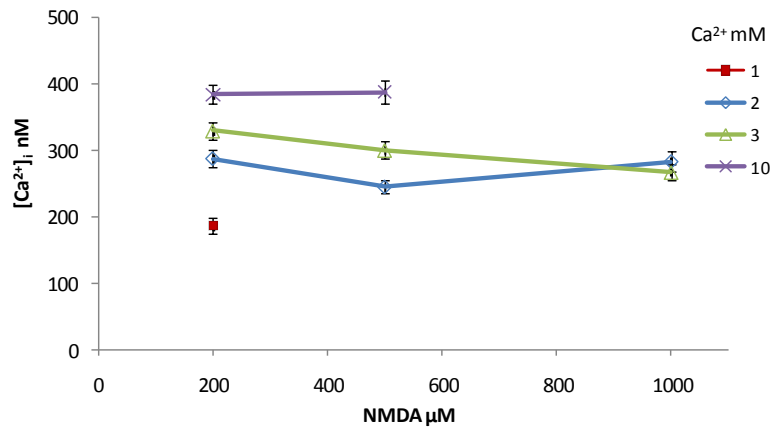
3.2.1 NMDA dose-respons i cerebellære granulærceller

NMDA-indusert Ca^{2+} -økning i rCGN har blitt karakterisert tidligere i samme laboratoriet, der man fant en EC_{50} på 30-40 μM NMDA, med nivåer på cirka 100 nM Ca^{2+} (Ring and Tansø 2007). Figur 3.2 viser motsvarende responser på mCGN, hvor det ble sett på dose-responser til både glutamat og NMDA. Figur 3.3 viser $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i rCGN ved maksimal stimulering, med NMDA-konsentrasjoner 200 μM til 1 mM og 1-10 mM Ca^{2+} . Høyere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -nivå ble vist i musemodellen.



Figur 3.2 Dose-respons kurver til NMDA og glutamat- stimulert $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i mCGN.

Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm SEM. $n=8$.

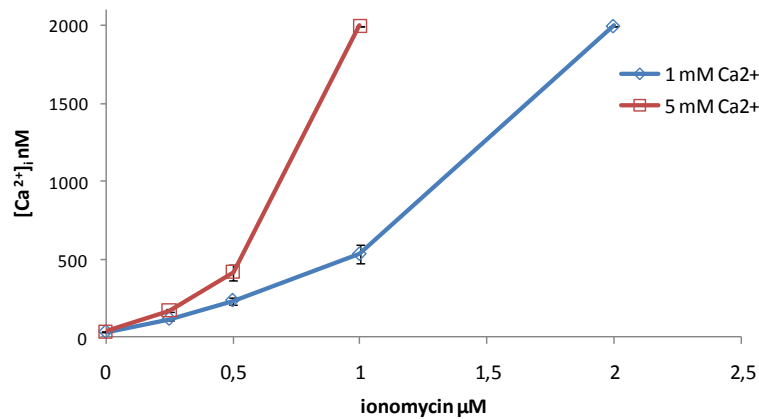


Figur 3.3 NMDA-stimulert $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i rCGN. Kurvene viser forskjellige $[\text{Ca}^{2+}]$ i buffer. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. $n=8$.

3.2.2 Karakterisering av $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -økning med ionomycin

Ionomycin er en ionofor som selektivt transporterer Ca^{2+} over cellemembranen. Dette er en måte å få økt $[\text{Ca}^{2+}]$ inne i cellen. Forskjellige konsentrasjoner av ionomycin og Ca^{2+} ble testet ut for å øke $[\text{Ca}^{2+}]_i$, uavhengig av glutamat stimulering. Forsøk ble utført på cellelinjen SH-SY5Y og deretter på mCGN og rCGN, for sammenligning.

Cellelinjen SH-SY5Y ble benyttet for å teste ionomycin effekt på $[\text{Ca}^{2+}]_i$, uavhengig av NMDAR (SH-SY5Y uttrykker ikke NMDAR), (figur 3.4). Konsentrasjoner som ble anvendt var 1 mM og 5 mM Ca^{2+} og 0,25 μM - 2 μM ionomycin. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ steg med økt ekstracellulær Ca^{2+} og ionomycin.

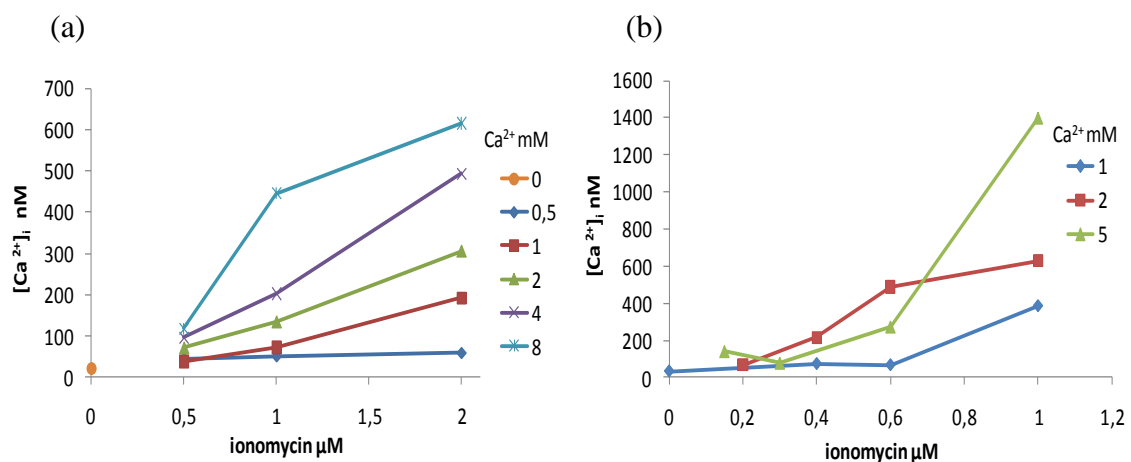


Figur 3.4 Effekt av ionomycin og Ca^{2+} i buffer på $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i cellelinjen SH-SY5Y.

Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm SEM. $n=8$.

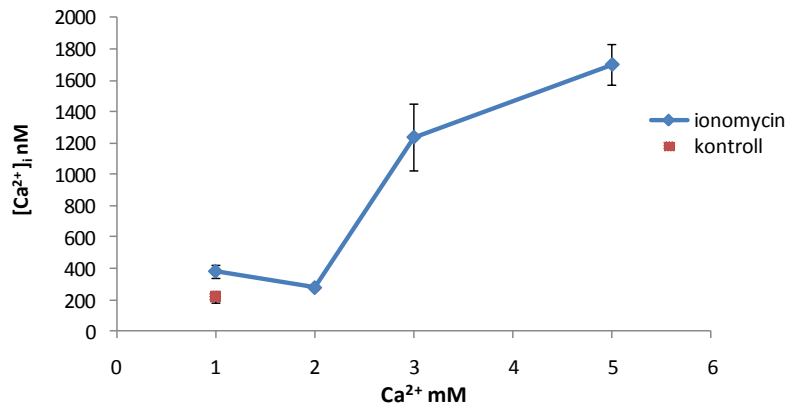
Videre ble det undersøkt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -nivåer med ionomycin i rCGN. Førsøk ble kjørt i 10 minutter (figur 3.5 a) for å teste hvor raskt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ øker med ionomycin.

8 mM Ca^{2+} med 2 μM ionomycin ga høy $[\text{Ca}^{2+}]_i$, allerede etter 10 minutter. Ettersom toksisitetstester skulle utføres med Ca^{2+} -belastning over 30 minutter, ble forsøksiden økt til 30 minutter men ionomycin konsentrasjon redusert (figur 3.5 b). 250 nM MK-801 ble tilsatt for å hindre Ca^{2+} -influks gjennom NMDAR.



Figur 3.5 Effekt av ionomycin og Ca^{2+} i buffer på $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i rCGN. Utført i "plate mode" med 250 nM MK-801 i (a) 10 minutter og (b) 30 minutter. $n=8$.

På lignende måte ble ionomycin effekten i mCGN studert. 0,2 μM ionomycin ble benyttet med forskjellige Ca^{2+} -konsentrasjoner. Figur 3.6 viser at allerede med 3 mM Ca^{2+} var toksiske Ca^{2+} -nivåer (over 500 nM) nådd. I rotte granulærceller måtte man opp i høyere ionomycin konsentrasjon for å få høy $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se figur 3.5. Større $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -nivå i mus enn i rotte ble også vist i sammenheng med andre stoffer (se avsnitt 3.2.3).



Figur 3.6 Dose-respons kurve til 0,2 μM ionomycin i mCGN, med forskjellig $[\text{Ca}^{2+}]$ i buffer. Kontrollen (firkant) er med 0 ionomycin, 1 mM Ca^{2+} . Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm SEM. $n=8$.

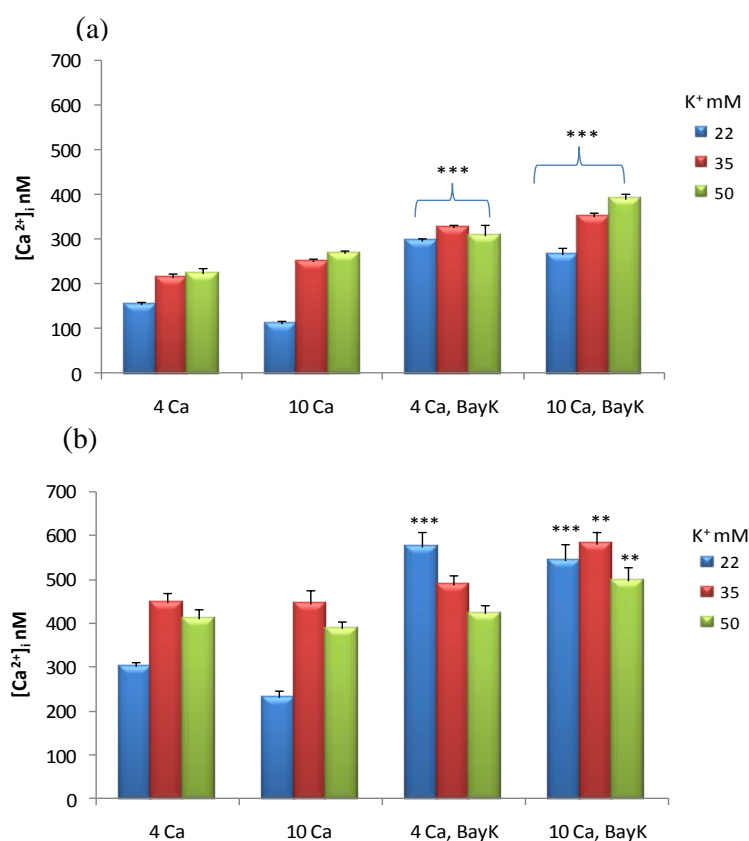
$[\text{Ca}^{2+}]_i$ økte kraftig på en halv time i modellene som ble benyttet. Økningen var superlineær med økt ionomycin (figur 3.4, 3.5 b).

3.2.3 Karakterisering av $[Ca^{2+}]_i$ -økning med K^+ -depolarisering

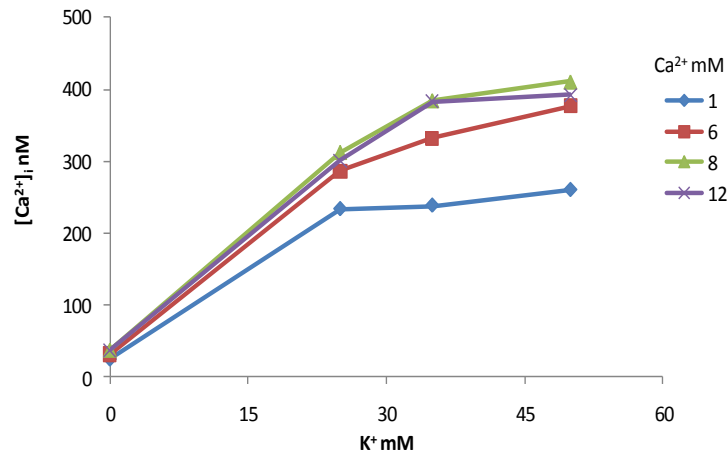
Det ble gjort forsøk for å undersøke om det var mulig å få en kraftig økning i $[Ca^{2+}]_i$ gjennom influks ved depolarisering, bl.a. via HVA-kanaler (Ca^{2+} -kanaler som aktiveres via depolarisering, se innledning).

BayK 8644 (HVA-kanal modulator, øker aktiviteten til kanalen) sammen med K^+ -depolarisering ble anvendt for å aktivere disse kanalene. Figur 3.7 viser effekten av 22 mM, 35 mM og 50 mM K^+ , med og uten 10 μ M BayK 8644, utført både i mus og rotte CGN. $[Ca^{2+}]$ var på 4 mM og 10 mM. Økning i $[Ca^{2+}]_i$ i mus var generelt høyere; begge viste høyere Ca^{2+} -nivåer med BayK 8644, mens det ikke var noe stor forandring i respons mellom 4 mM og 10 mM $[Ca^{2+}]$.

Det ble bestemt for å utføre en mer detaljert studie med K^+ -depolarisering kun på rotte modellen (figur 3.8).



Figur 3.7 Effekt av K^+ -depolarisering på $[Ca^{2+}]_i$ utført i (a) rCGN og (b) mCGN. Utført i "plate mode" med 250 nM MK-801 i 30 minutter. 4 Ca, 10 Ca= 4 mM, 10 mM Ca^{2+} , BayK = 10 μ M BayK 8644. Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm SEM. n=8. Signifikans ble testet mot 4 mM og 10 mM Ca^{2+} uten BayK 8644. ** p < 0,01, *** p < 0,001.

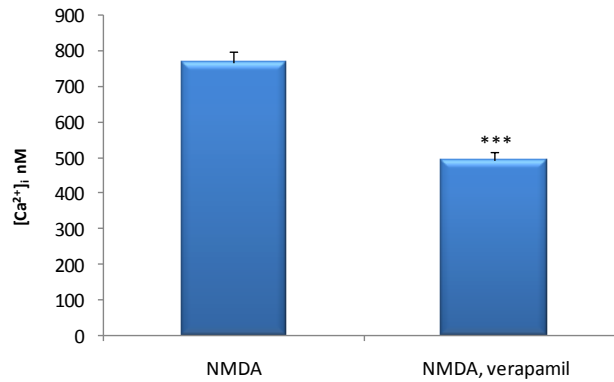


Figur 3.8 Effekt av 50 mM K⁺-depolarisering med 10 µM BayK og Ca²⁺ i buffer i rCGN. Utført i ”plate mode” med 250 nM MK-801 i 30 minutter. n=8.

Figur 3.7 og 3.8 viser at man må ha BayK 8644, høy [K⁺] og høy [Ca²⁺] for å nå høyere nivåer i [Ca²⁺]_i. 250 nM MK-801 ble tilsatt for å blokkere [Ca²⁺]_i influks via NMDAR. I videre forsøk med depolarisering ble det benyttet 35-50 mM K⁺ i kombinasjon med 10 µM BayK 8644.

Det var av interesse å se hvor mye av økningen av [Ca²⁺]_i ved NMDA-stimulering kommer av indirekte aktivering av spenningsstyrte HVA-kanaler og annen depolariseringsindusert Ca²⁺-influks, det vil si på grunn av NMDA- indusert depolarisering.

500 µM NMDA med og uten 25 µM verapamil (HVA- kanal antagonist) ble sammenlignet, hvor inhibitoren viste en signifikant nedgang i [Ca²⁺]_i (figur 3.9).



Figur 3.9 Blokkering av HVA-kanaler med verapamil, i kombinasjon med NMDA i mCGN.

[verapamil] = 25 μ M, [NMDA] = 500 μ M. Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm SEM. n=8.

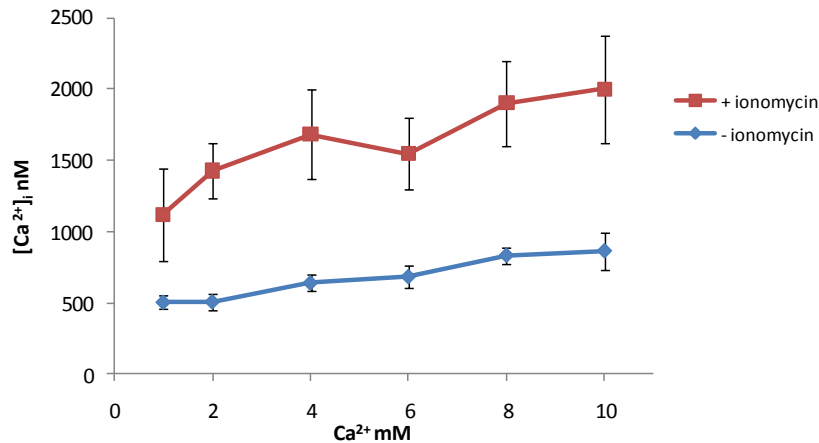
*** p < 0,001.

3.2.4 Karakterisering av [Ca²⁺]_i-økning med K⁺-depolarisering og ionomycin

Da K⁺-depolarisering ikke ga høy intracellulær Ca²⁺-nivå, ble det prøvd å få økt [Ca²⁺]_i ved å bruke ionomycin i tillegg til 50 mM K⁺.

Forsøk ble først utført i modellen ”well mode” (se metodedel), hvor det ble vist tidlige effekter (under 30 sek) på [Ca²⁺]_i-nivåer (figur 3.10). 0,7 μ M ionomycin med forskjellige konsentrasjoner Ca²⁺ i buffer (1-10 mM) ble benyttet, med 250 nM MK-801 (for å hindre innstrømning av Ca²⁺ via NMDAR).

K⁺-depolarisering med økende [Ca²⁺] i buffer økte [Ca²⁺]_i. I kombinasjon med ionomycin var denne økningen mye større, selv om det var stor spredning i effekten av ionomycin.

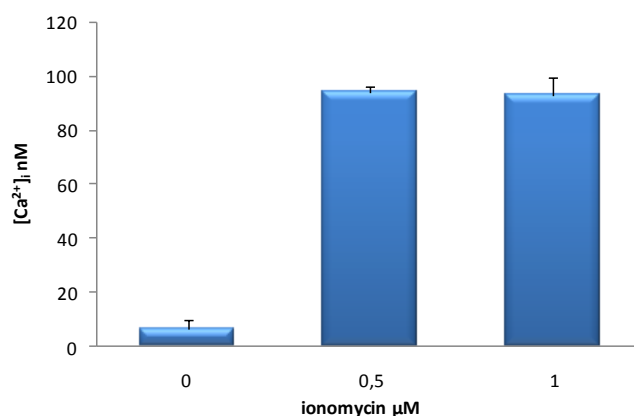


Figur 3.10 Økt $[Ca^{2+}]_i$ i rCGN med $0,7 \mu M$ ionomycin. $[Ca^{2+}]$ ble tilsatt til 96-brettet fra begynnelsen av forsøket. $50 \text{ mM } K^+$ ble injisert automatisk med injektorene etter 6 sekunder. Forsøket ble utført i modellen "well mode". Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm SEM. $n=8$.

På grunn av stor variabilitet i Ca^{2+} -nivåene med ionomycin over tid, ble cellene preinkubert med ionomycin istedenfor å ha ionomycin samtidig med ulike stimulasjoner. Dette for å se om det ga mer stabile Ca^{2+} -verdier og en mer kontinuerlig Ca^{2+} -økning.

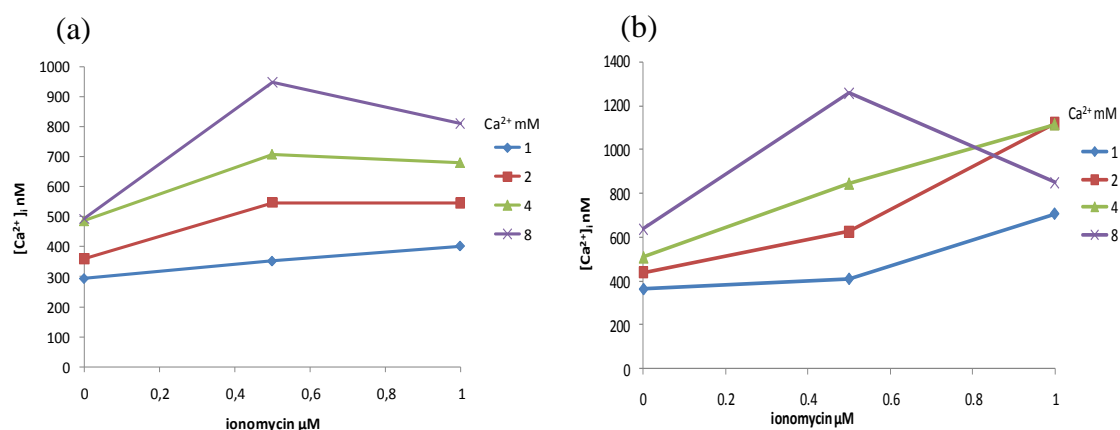
For å undersøke om cellene går tilbake til sin "normale nivå" ble disse først preinkubert med $0,5 \mu M$ eller $1 \mu M$ ionomycin i 6 minutter, hvor deretter de ble vasket med standard buffer.

Figur 3.11 viser lav $[Ca^{2+}]_i$ -økning etter ionomycin preinkubering og påfølgende vask med standard buffer, hvor det ikke var noen forskjell mellom $0,5 \mu M$ og $1 \mu M$ ionomycin.



Figur 3.11 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ etter ionomycin preinkubering og påfølgende vask med standard buffer. Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm SEM. $n=8$.

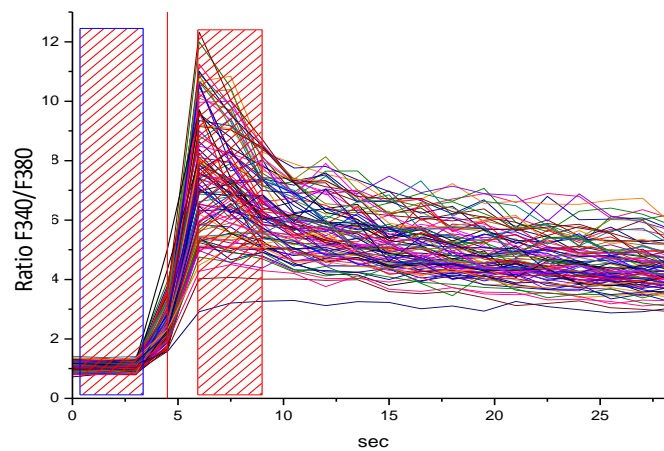
I figur 3.12 vises effekt av 50 mM K^+ -depolarisering med ulike $[\text{Ca}^{2+}]$ etter 10 og 30 minutters preinkubering med ionomycin. Etter 30 minutter med preinkubering er effekten større enn etter 10 minutter. Det er interessant at med høy Ca^{2+} i buffer gikk $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ned ved 1 μM ionomycin. Det ble ikke forsøkt å finne en forklaring for denne effekten, men den vist selv i "plate mode" forsøk; se figur 3.14.



Figur 3.12 Effekt av K^+ -depolarisering og Ca^{2+} i buffer etter preinkubering med ionomycin i rCGN, utført i "well mode". Preinkuberingstiden var (a) 10 minutter og (b) 30 minutter. 10 μM BayK 8644 ble anvendt sammen med 50 mM K^+ . Cellene ble vasket med standard buffer (uten fosfat), før forsøksstoffene ble tilsatt. $n=8$.

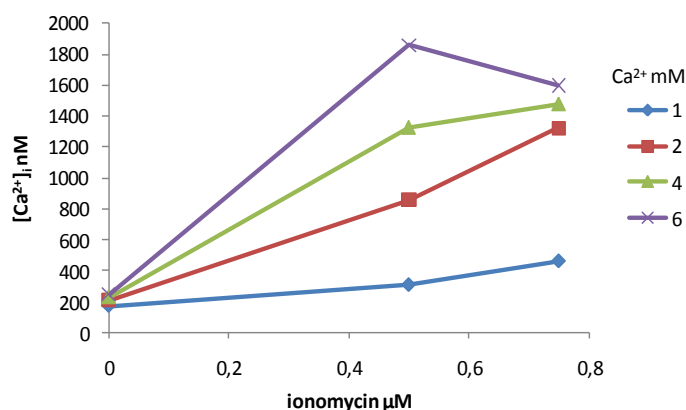
Med "well mode" metoden er det mulig å se initialresponsen. Hver brønn avleses med 1,5 sekunders intervall i 30 sekunder etter injeksjon med K^+ (30 sek/brønn), se figur 3.13. Avlesing av en hel dose-respons med 96-brønner tar rundt en time.

Ettersom protokollen for toksisitetsstress var 30 minutter, var det av interesse å se økning i brønnene under lengre perioder enn 30 sekunder. Derfor ble det også kjørt forsøk i "plate mode", der K^+ ble injisert i alle brønner og siden ble alle brønner avlest ved 340 nm og deretter 380 nm. En syklus for å måle 96 brønner var et intervall på cirka 1,5 minutt.



Figur 3.13 Emisjons ratio (340/380) til fluorescensen etter bakgrunns subtraksjon i rCGN for 96-brønner med 50 mM K^+ -depolarisering i modellen "well mode". Figuren illustrerer hvilken del av kurvene som ble brukt til beregning av data. Rektangelet til venstre viser hvor baseline ble målt, mens rektangelet til høyere viser måling av initialresponsen. Den røde linjen viser tiden da K^+ ble injisert.

Lignende forsøk ble kjørt, denne gangen i "plate mode" med ionomycin preinkubering i 30 minutter (figur 3.14). Det var høy $[Ca^{2+}]_i$ med økt ionomycin og $[Ca^{2+}]$ i buffer, mens effekten ble redusert med høyest konsentrasjon Ca^{2+} og ionomycin.



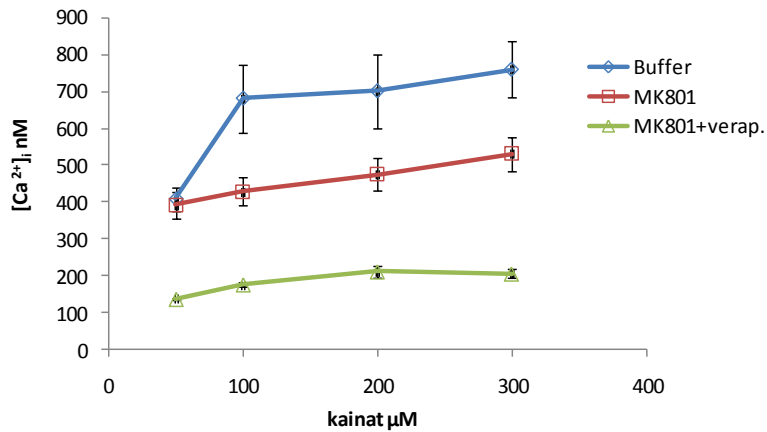
Figur 3.14 Effekt av K^+ -depolarisering og Ca^{2+} i buffer etter preinkubering med ionomycin i rCGN, utført i ”plate mode” i 30 minutter. 10 μM BayK 8644 ble anvendt sammen med 50 mM K^+ . Cellene ble vasket med standard buffer (uten fosfat), før forsøksstoffene ble tilsatt. $n=8$.

Ut ifra resultatene ovenfor ga depolarisering med K^+ og preinkubering med ionomycin bedre effekt i $[\text{Ca}^{2+}]_i$, og det ble bestemt å fortsette med 30 minutters preinkubering i tillegg til K^+ -depolarisering i videre forsøk.

3.2.5 Kainat-indusert $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -økning

Forskjellige kainat konsentrasjoner ble benyttet i kombinasjon med og uten 250 nM MK-801 og 25 μM verapamil.

Figur 3.15 viser at kainat økte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ til høye nivåer men at effekten var i høy grad via aktivering av NMDAR og HVA-kanaler. Med kainat var $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rundt 700 nM, men ved blokkering av NMDAR og HVA-kanaler med sine respektive inhibitorer, MK-801 og verapamil, ble effekten tydelig redusert. Det betyr at ren AMPAR /kainatreseptor aktivering gir lav $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Det samme gjaldt ved studien på celledød (se avsnitt 3.3.1).

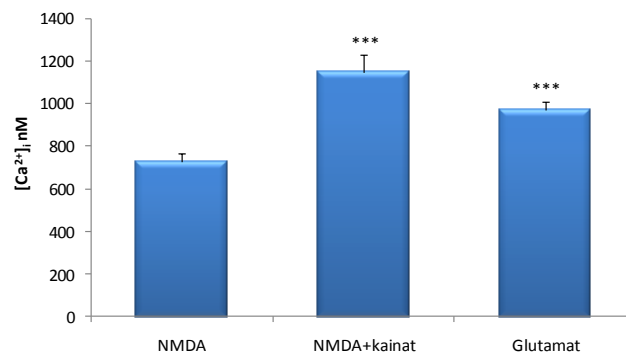


Figur 3.15 Effekt av kainat (blå kurve), kainat og MK-801 (rød kurve) og kainat i kombinasjon med MK-801 og verapamil (grønn kurve) på $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i mCGN.

[MK-801] = 250 nM; verap = [verapamil] = 25 μM . Resultater er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. n=8.

Siden kainat hadde lav effekt på $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ved inhibisjon av HVA-kanaler og NMDAR, var det interessant å se effekten til NMDA i kombinasjon med kainat og om den skilte seg fra ren NMDA effekt. 100-500 μM NMDA/glutamat og 200 μM kainat ble anvendt (NMDA og kainat ble anvendt sammen). Gjennomsnitt av konsentrasjonene ble beregnet, og stoffene ble sammenliknet mot hverandre, se figur 3.16.

Kombinasjon av NMDA og kainat ga ikke bedre effekt enn glutamat (ikke signifikant, $p > 0,05$), men bedre enn bare NMDA ($p < 0,001$). Forskjellen i $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mellom NMDA og glutamat var signifikant ($p < 0,001$).



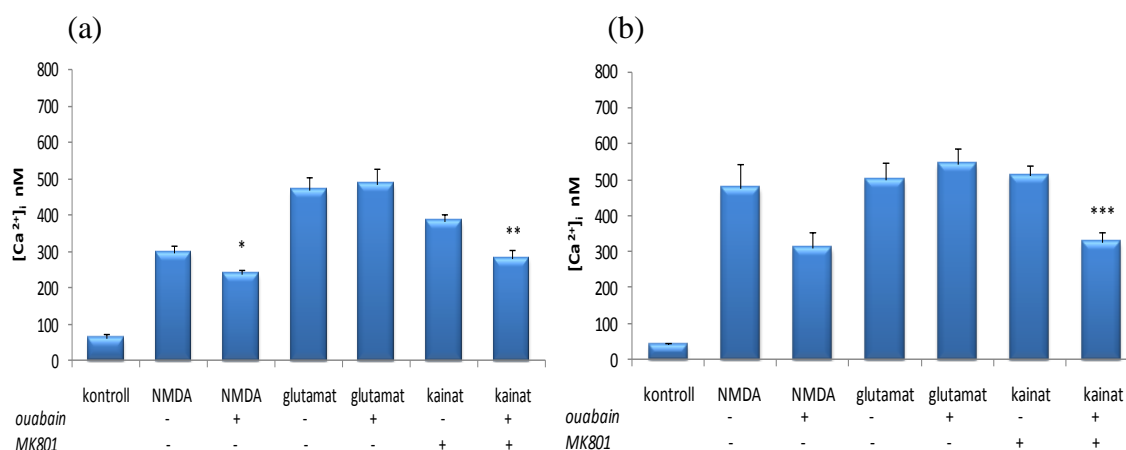
Figur 3.16 Effekt av NMDA, NMDA i kombinasjon med kainat og glutamat på $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i mCGN.

Gjennomsnitt og SEM ble slått sammen ("pooled") for konsentrasjonene 100-500 μM NMDA (+200 μM kainat) og glutamat. n=8. Signifikans ble testet mot NMDA. *** $p < 0,001$.

Siden kainat ikke ga så stor effekt selv (etter blokkering av NMDAR) ble det besluttet å ikke bruke denne i videre forsøk, men fortsette bruk av K^+ -depolarisering i kombinasjon med preinkubering med ionomycin.

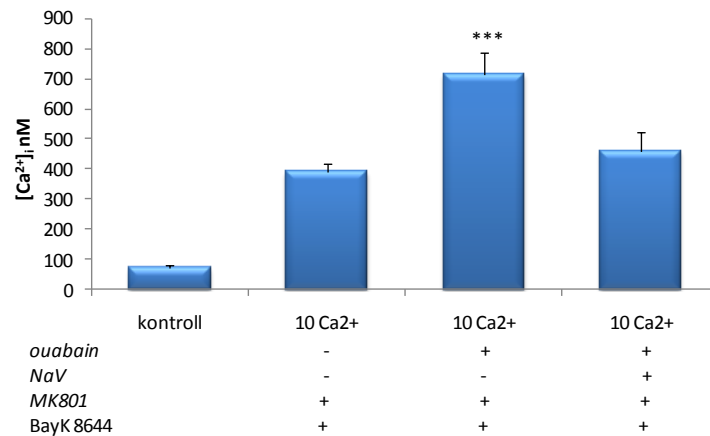
3.2.6 Effekt på $[Ca^{2+}]_i$ med blokkering av Na^+/K^+ -ATPase

Effekt på $[Ca^{2+}]_i$ via hemming av Na^+/K^+ -ATPasen med ouabain ble studert. Figur 3.17 viser $[Ca^{2+}]_i$ i rotte og mus. Ut ifra figuren ser man at det ikke var stor forskjell mellom artene. Konsentrasjonene til stoffene som ble benyttet var 500 μM NMDA, glutamat og kainat, 1 mM ouabain og 250 nM MK-801. Det ble funnet at ouabain ga en uventet reduksjon i $[Ca^{2+}]_i$.



Figur 3.17 Effekt av ouabain på $[Ca^{2+}]_i$ i nærvær av glutamaterge agonister i (a) rCGN og (b) mCGN. Cellene ble depolarisert med 25 mM K^+ . $[NMDA] = [glutamat] = [kainat] = 500 \mu M$; $[ouabain] = 1 mM$; $[MK-801] = 250 nM$. $[Ca^{2+}] = 1 mM$. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. $n=8$. Signifikans ble testet mot samme stoffet uten ouabain. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

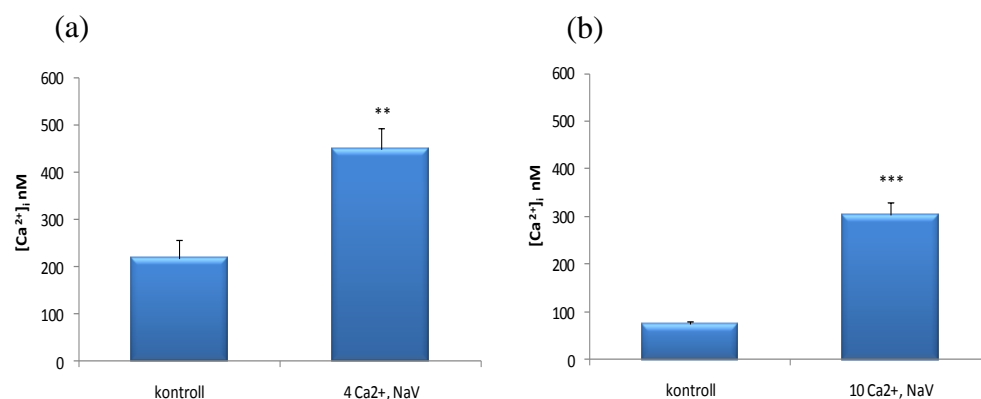
På grunn av den uventede effekten til ouabain, ble det undersøkt om ouabain har effekt når glutamaterge agonister ikke er til stede. Resultatene viste en signifikant økning ($p < 0,001$) i $[Ca^{2+}]_i$ (figur 3.18). En PMCA-hemmer, natriumvanadat (NaV), ga ingen ytterligere økning i $[Ca^{2+}]_i$ i kombinasjon med ouabain. I følge resultatene virker ouabain kun å ha effekt når GluR ikke er aktivert (se diskusjon).



Figur 3.18 Effekt av ouabain på $[Ca^{2+}]_i$ i rCGN. Cellene ble depolarisert med 25 mM K^+ . $[Ca^{2+}] = 10$ mM, $[BayK\ 8644] = 10$ μ M, $[MK-801] = 250$ nM, $[ouabain] = 1$ mM, $[natriumvanadat, (NaV)] = 1$ mM. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. $n = 8$. Signifikans ble testet mot 10 mM Ca^{2+} uten ouabain. *** $p < 0,001$.

3.2.7 Effekt på $[Ca^{2+}]_i$ med blokkering av PMCA

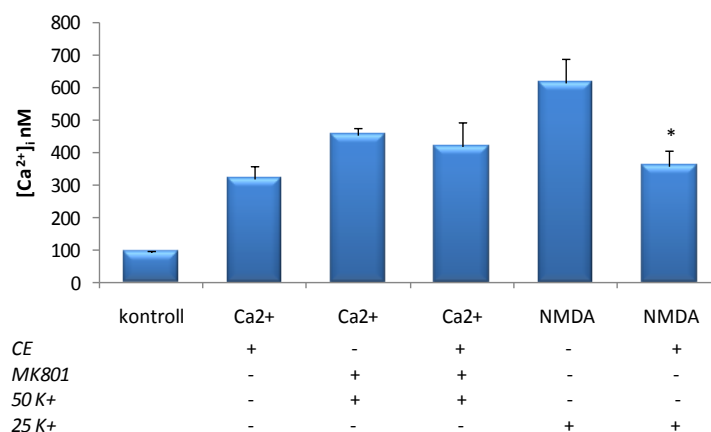
Siden PMCA hemmeren NaV i forrige forsøk (figur 3.18) ikke ga økning i $[Ca^{2+}]_i$ i nærvær av ouabain når cellene ble depolarisert, var det ønskelig å undersøke dette mer og teste økning i $[Ca^{2+}]_i$ med kun NaV. Figur 3.19 viser at NaV økte $[Ca^{2+}]_i$ signifikant. Forsøk ble utført både i mCGN og rCGN, hvor effekten i mus igjen var større enn i rotte.



Figur 3.19 Effekt av NaV på $[Ca^{2+}]_i$ i (a) mCGN med 4 mM Ca^{2+} , og (b) rCGN med 10 mM Ca^{2+} . $[NaV] = 3$ mM, $[MK-801] = 250$ nM. Resultater er presentert som gjennomsnitt \pm SEM. $n=8$. Signifikans ble testet mot kontroll. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En annen PMCA inhibitor; carboxyeosin (CE), ble testet for å se om den hadde bedre effekt på $[Ca^{2+}]_i$.

CE ga ingen betydelig økning i $[Ca^{2+}]_i$ (figur 3.20). Det kan være en mulig interferens med NMDAR, da CE ga signifikant nedgang i intracellulær Ca^{2+} med 500 μ M NMDA.



Figur 3.20 Effekt av CE på $[Ca^{2+}]_i$ i mCGN. $[Ca^{2+}] = 10$ mM; $[CE] = 10$ μ M; $[MK-801] = 250$ nM; $[NMDA] = 500$ μ M; $[K^+] = 50$ mM; $[K^+]_{NMDA} = 25$ mM; 50 mM K^+ er i kombinasjon med 10 μ M BayK 8644. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. $n = 8$. Signifikans ble testet mot NMDA uten CE. * $p < 0,05$.

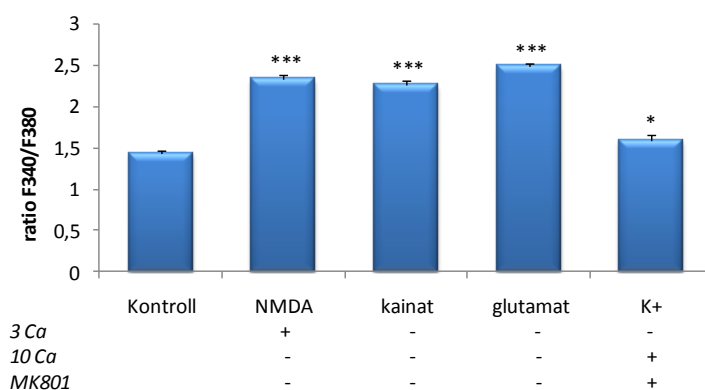
Resultatene var ikke entydige nok, og siden det var usikkert hvordan disse skulle tolkes, ble det besluttet å ikke fortsette med PMCA-blokkering som en mulig måte å øke $[Ca^{2+}]_i$.

3.2.8 $[Na^+]_i$ -økning ved aktivering av NMDAR og depolarisering

Aktivering av NMDAR fører til innstrømming av både Na^+ og Ca^{2+} -ioner, mens K^+ -depolarisering med BayK 8644 og ionomycin gir hovedsakelig aktivering av HVA-kanaler, selektive for Ca^{2+} -ioner, og influks gjennom reversering av NCX og NCKX (se innledning). Det ble studert om ulike stimulasjoner ga forskjeller i $[Na^+]_i$.

Konsentrasjonen i cellen ble målt ved hjelp av den selektive Na^+ -indikatoren SBFI (Na^+ -bindende benzofuran isoftalat).

Figur 3.21 viser at det var høy respons i $[Na^+]_i$ med NMDA, kainat og glutamat; noe som var forventet. K^+ -depolarisering ga ingen beydelig økning i $[Na^+]_i$. På grunn av vanskeligheter i kalibrering av $[Na^+]_i$, er det vist ratioforandringer istedenfor respons i nM.



Figur 3.21 Gjennomsnittlig $[Na^+]_i$ i rCGN, vist som ratio F340/F380.

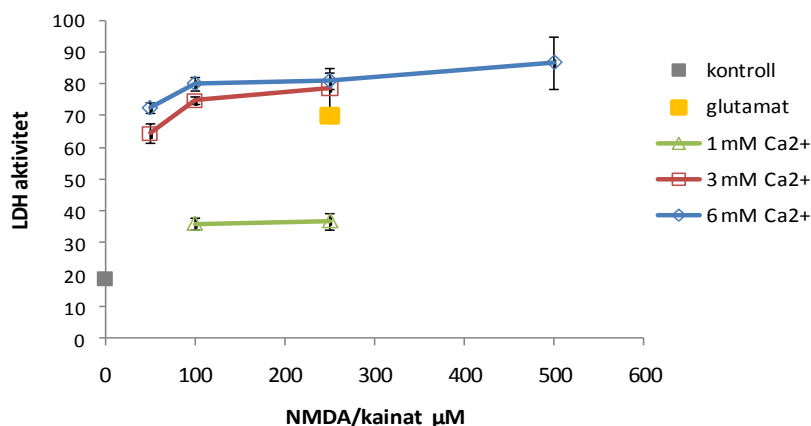
3Ca,10Ca = 3 resp. 10 mM Ca^{2+} , [NMDA] = 500 μ M, [kainat] = 200 μ M, [glutamat] = 250 μ M, $[K^+] = 50$ mM, [MK-801] = 250 nM. Resultater er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. n=8. Signifikans ble testet mot kontroll, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

3.3 Celledød under Ca^{2+} -belastning

3.3.1 Glutamaterg celledød

NMDA-indusert celledød er godt beskrevet i litteraturen.

I avsnitt 3.2.5 ble det vist at NMDA og kainat i kombinasjon ga høyere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ enn NMDA alene (figur 3.16). Det var interessant å undersøke om denne kombinasjon (begge i samme konsentrasjon) sammen med Ca^{2+} i buffer ga høy celledød, og sammenligne med glutamatindusert toksisitet. Figur 3.22 viser at det er ingen større forskjell mellom 3 mM og 6 mM Ca^{2+} , men heller ikke mellom 100 μM og 200 μM av kombinasjon med NMDA og kainat (cellene stimuleres med både NMDA og kainat samtidig).



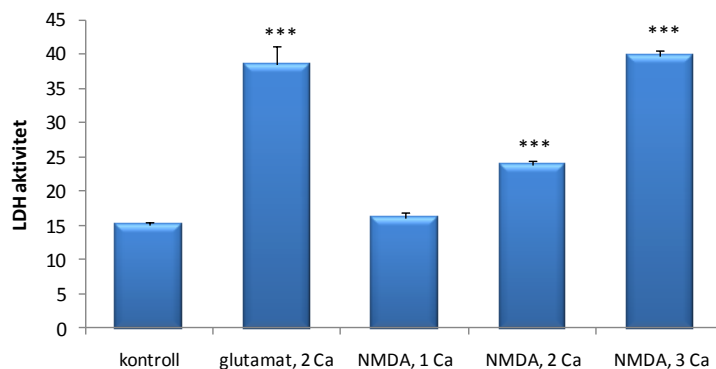
Figur 3.22 Toksisitet av NMDA i kombinasjon med kainat og Ca^{2+} i buffer i rCGN.

$[\text{NMDA}] = [\text{kainat}] = 50 \mu\text{M}, 100 \mu\text{M}, 250 \mu\text{M}, 500 \mu\text{M}$, $[\text{glutamat}] = 250 \mu\text{M}$.

Resultater er vist som gjennomsnitt \pm SEM. $n = 4$.

Tidligere forsøk viste at 100 – 250 μM NMDA ikke ga pålitelig reproducerbar celledød. Derfor ble det valgt en konsentrasjon på 500 μM (etter anbefaling fra Prof. Ann M. Marini, Bethesda, USA; personlig kommunikasjon) for å provosere fram toksisitet. Det var ønskelig å teste hvor høy $[\text{Ca}^{2+}]$ må være for å få celledød med 500 μM NMDA. 500 μM NMDA ble derfor studert ved ulike Ca^{2+} -konsentrasjoner og sammenlignet med toksisitet til 200 μM glutamat. Det ble vist at konsentrasjon til Ca^{2+} i buffer må

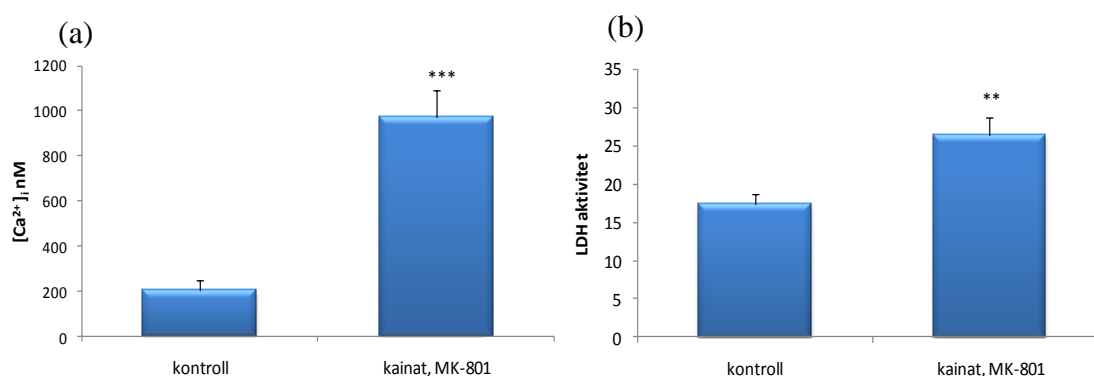
være minst 3 mM, for å nå toksiske Ca^{2+} -nivåer og celledød fra NMDA, som kunne sammenlignes med celledød fra glutamat med 2 mM Ca^{2+} (figur 3.23).



Figur 3.23 Toksisitet av glutamaterge agonsiter (glutamat, NMDA) i kombinasjon med Ca^{2+} i buffer i rCGN. glutamat, 2 Ca = 200 μM glutamat og 2 mM Ca^{2+} ; NMDA = NMDA 500 μM ; 1,2,3 Ca = 1,2,3 mM Ca^{2+} . Resultater er vist som gjennomsnitt \pm SEM. n=8. Signifikans ble testet mot kontroll. *** $p < 0,001$.

Da kainat ga økt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (se avsnitt 3.2.5), ble det undersøkt om den ville gi høy toksisitet, figur 3.24. Det var interessant at selv om $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -nivå var høy med 500 μM kainat, var det ikke mye celledød sammenlignet med kontroll.

Forsøk ble utført parallelt på samme batch celler, og dette gjelder for alle forsøk der toksisitet (LDH-frigjøring) og Ca^{2+} ble studert.



Figur 3.24 Effekt av kainat i kombinasjon med MK-801 på (a) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ og (b) toksisitet i rCGN. [kainat] = 500 μM , [MK-801] = 250 nM. Resultater er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. n=8.

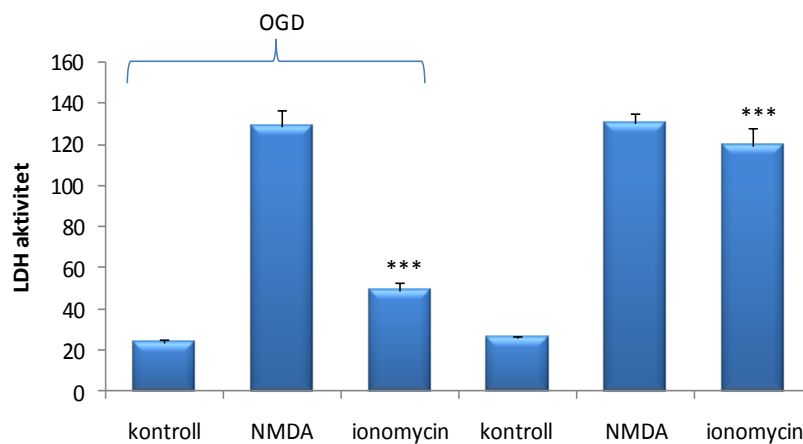
** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.3.2 OGD-indusert celledød

En viktig eksitotoksisk modell for hjerneslag/iskemi er oksygen og glukose deprivasjon (OGD). OGD gir redusert ATP produksjon, hvilket gir langsommere regulering av membranpotensial og svekket Ca^{2+} -regulering.

Dermed var det interessant å teste om fjerning av oksygen og glukose ville gi økt toksisitet. Forsøk ble utført med OGD, (se metodedel), hvor cellene først ble preinkubert med buffer uten glukose i 30 minutter og deretter utsatt for NMDA og ionomycin i kombinasjon med OGD (stress i 30 minutter; 500 μM NMDA med 3 mM Ca^{2+} ; 1 μM ionomycin med 1,25 mM Ca^{2+}).

Figur 3.25 viser at OGD ikke førte til høy celledød, tvert imot; med ionomycin ble det vist at OGD ga en signifikant reduksjon i toksisitet.



Figur 3.25 OGD-indusert toksisitet i rCGN. Cellene ble sultet for glukose i 30 minutter og deretter utsatt for NMDA og ionomycin i kombinasjon med OGD i 30 minutter.

NMDA = 500 μM NMDA med 3 mM Ca^{2+} ; ionomycin = 1 μM ionomycin med 1,25 mM Ca^{2+} .

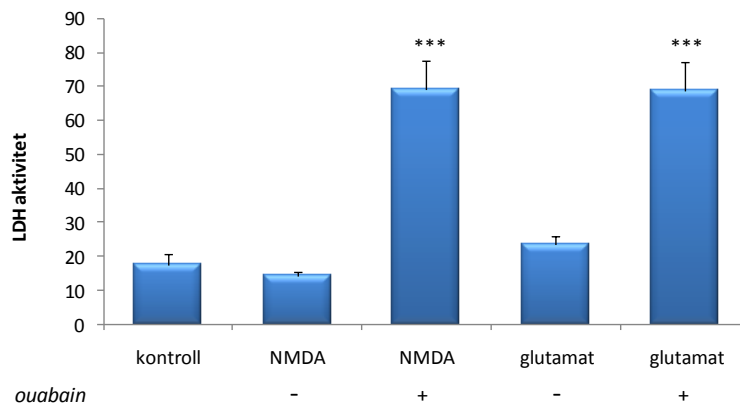
OGD = oksygen-glukose deprivasjon. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. n=8. Signifikans ble testet mot kontroll og ionomycin med OGD. *** p < 0,001.

3.3.3 Ouabain-indusert celledød

Na^+/K^+ -ATPase-hemmeren, ouabain, ga en reduksjon i $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i kombinasjon med glutamaterge agonister (avsnitt 3.2.6). Dermed var det viktig å undersøke om ouabain ville gi toksisitet.

Resultatene viser at NMDA og glutamat i kombinasjon med ouabain ga mye mer celledød enn NMDA og glutamat alene, selv om Ca^{2+} -nivåene var mindre med ouabain (figur 3.26).

Fortsettelse med Na^+/K^+ -ATPase hemmeren var ikke aktuelt, ettersom den ikke økte $[\text{Ca}^{2+}]_i$.



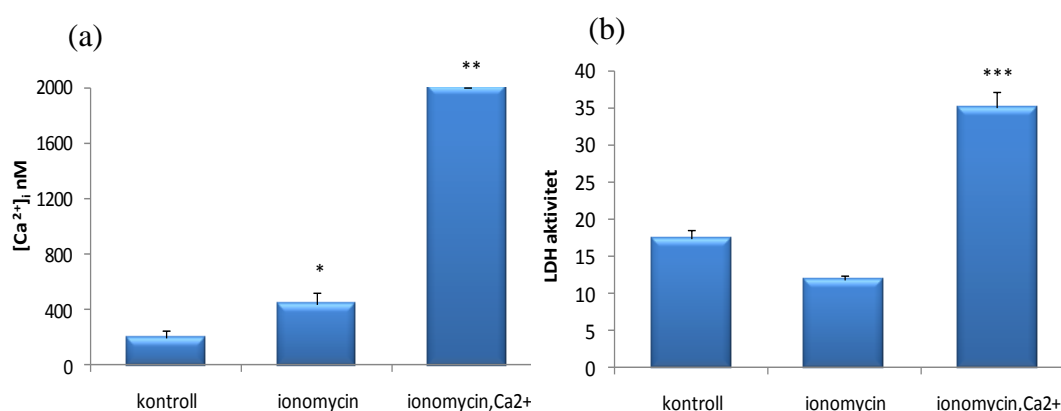
Figur 3.26 Effekt av ouabain på toksisitet i rCGN i nærvær av NMDA og glutamat.

[NMDA] = 500 μM ; [glutamat] = 500 μM ; [ouabain] = 1 mM. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. n=8. Signifikans ble testet mot NMDA og glutamat uten ouabain. *** $p < 0,001$.

3.3.4 Ionomycin-indusert celledød

Figur 3.27 a viser lav $[Ca^{2+}]_i$ -økning med 0,3 μM ionomycin, men kombinasjon med 10 mM Ca^{2+} i buffer nådde toksisitetsnivå. Størst effekt på celledød ble vist med ionomycin i kombinasjon med 10 mM Ca^{2+} (figur 3.27 b). MK-801 ble tilsatt for å hemme ioninnstrømning via NMDAR.

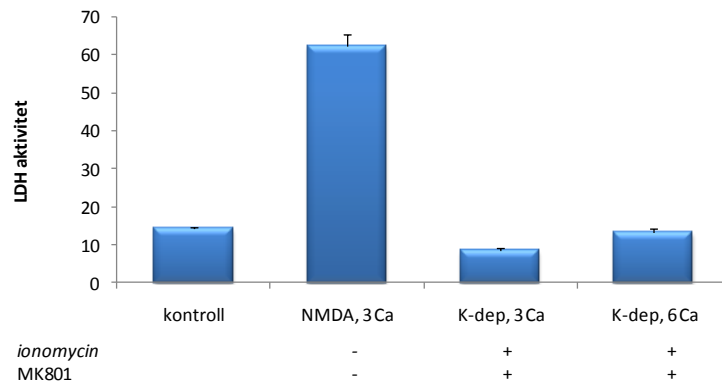
Det betyr at om man øker Ca^{2+} lenge nok med høy konsentrasjon (i dette fallet over 2000 nM) får man celledød av Ca^{2+} -overbelastning.



Figur 3.27 Effekt av ionomycin på (a) $[Ca^{2+}]_i$ og (b) toksisitet i rCGN med 250 nM MK-801.

Ionomycin = 0,3 μM ionomycin med 1.25 mM Ca^{2+} ; ionomycin, Ca^{2+} = 0,3 μM ionomycin med 10 mM Ca^{2+} . Resultater er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. n=8. Signifikans ble testet mot kontroll i (a) og (b); og mot ionomycin i (a). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Videre ble 50 mM K^+ og 0,2 μM ionomycin (med 3 mM og 6 mM Ca^{2+}) testet, for å konstatere om det ville føre til mer toksisitet (figur 3.28). Men ikke en gang K^+ -depolarisering, i kombinasjon med ionomycin og høy Ca^{2+} i buffer, ga noen betydelig celledød, når NMDAR var blokkert med MK-801.



Figur 3.28 Effekt av K^+ -depolarisering med ionomycin på toksisitet i rCGN.

NMDA = 500 μ M med 3 mM Ca^{2+} ; K-dep = 50 mM K^+ med 10 μ M BayK 8644, med 3 mM eller 6 mM Ca^{2+} ; ionomycin = 0,2 μ M; MK-801 = 250 nM. Resultater er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. n=8.

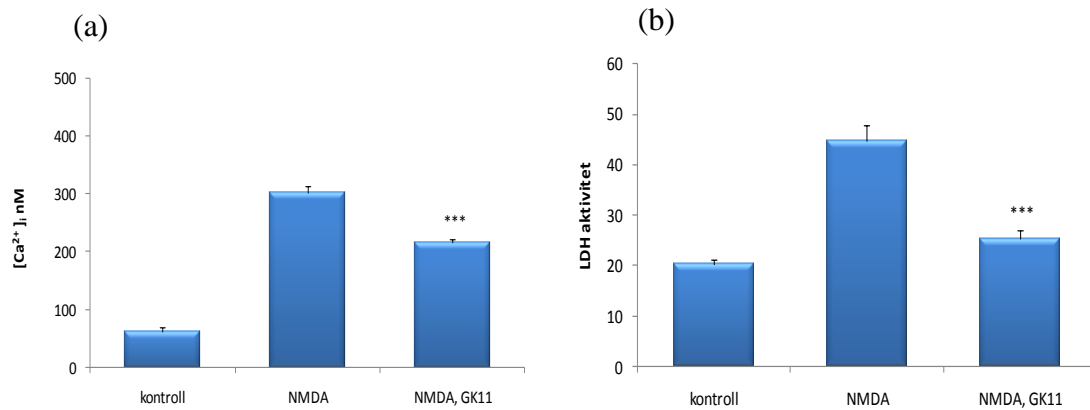
3.4 Aktivering av NMDAR med samtidig blokkering av ioneinfluks

Det var av interesse å undersøke toksisitet når man øker Ca^{2+} uavhengig av Ca^{2+} -fluks gjennom NMDAR-kanalen, og aktiverer NMDAR med NMDA og glysin, men blokkerer Ca^{2+} -influks gjennom NMDAR med ione kanalhemmere (for eksempel MK-801, GK 11 eller procyclidin). Disse forsøkene skiller seg fra de tidligere gjennom at man med intensjon aktiverte NMDAR med NMDA og glysin, samtidig som Ca^{2+} -influks ble blokkert.

3.4.1 Blokkering av NMDAR med GK11

Det var ønskelig å bekrefte først at blokkering av NMDAR-ione kanalen ga beskyttelse mot NMDA- induisert toksisitet. GK11 blokkerer kanalen i NMDAR (ikke-kompetitiv hemmer) men hindrer ikke annen aktivering av reseptoren.

Figur 3.29 viser at blokkering av Ca^{2+} -influks ved aktivering av NMDAR (500 μ M NMDA, 20 μ M glysin) gir redusert Ca^{2+} -respons og redusert celledød fra NMDA.

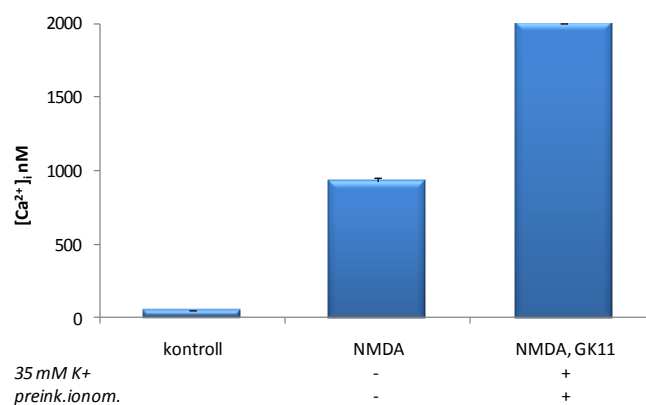


Figur 3.29 Effekt av GK 11 (gacyclidin) på (a) $[Ca^{2+}]_i$ og (b) toksisitet i rCGN.

[NMDA] = 500 μ M med 6 mM Ca^{2+} ; [GK11] = 200 nM. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. n=8 Signifikans ble testet mot NMDA. *** $p < 0,001$

Videre ble depolariseringsindusert Ca^{2+} -influks testet, med samtidig NMDAR-aktivering og blokkering av Ca^{2+} -influks gjennom reseptoren. Cellene ble preinkubert med 0,5 μ M ionomycin og deretter depolarisert med 35 mM K^+ og 10 μ M BayK 8644 for å gi Ca^{2+} -økning uavhengig av NMDAR. Figur 3.30 viser at selv med delvis blokkering av NMDAR med GK11 (figur 3.29), får man kraftig økning i Ca^{2+} -influks ved K^+ -depolarisering etter preinkubering med ionomycin.

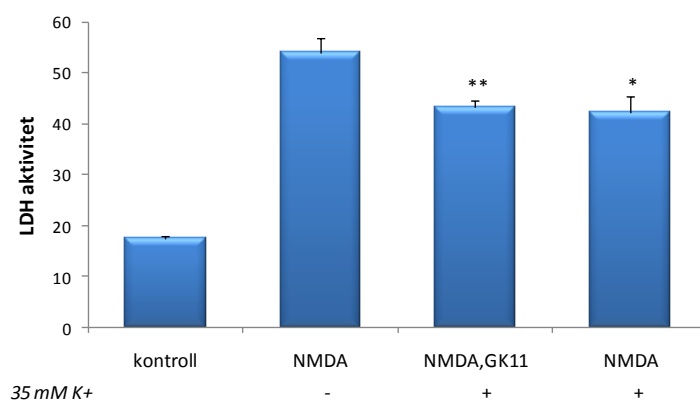
(For K^+ -depolarisering med 6 mM Ca^{2+} etter preinkubering med ionomycin, uten NMDA og GK11, når man også høye $[Ca^{2+}]_i$ -nivåer, se fig 3.14).



Figur 3.30 Effekt av GK 11 (gacyclidin) på $[Ca^{2+}]_i$ med ionomycin og K^+ -depolarisering.

[NMDA] = 500 μ M med 6 mM Ca^{2+} ; $[K^+] = 35$ mM med 10 μ M BayK 8644, [GK 11] = 200 nM; preink. ionom.= preinkubering med 0,5 μ M ionomycin. Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm SEM. n=8.

Toksisitet med NMDA og K^+ -depolarisering uten preinkubering med ionomycin (i nærvær av GK11) ble undersøkt; figur 3.31.



Figur 3.31 Toksisitet i rCGN med NMDA sammenlignet med kombinasjon av NMDA, GK11 og depolarisering. NMDA = 500 μ M med 6 mM Ca^{2+} ; K^+ = 35 mM med 10 μ M BayK 8644, GK 11 = 200 nM. Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm SEM. n=8. Signifikans ble testet mot NMDA uten depolarisering. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Det var interessant at K^+ -depolarisering reduserte toksisitet (med eller uten GK11). Det er mulig at GK11 er sterkt spenningsavhengig i NMDAR-blokkering, slik at med depolarisering til stede, må man ha høyere konsentrasjoner av inhibitoren (se diskusjon). Dermed ble MK-801 testet ut. MK-801 er den mest potente hemmeren av NMDAR.

3.4.2 NMDA og MK-801 i kombinasjon med K^+ -depolarisering

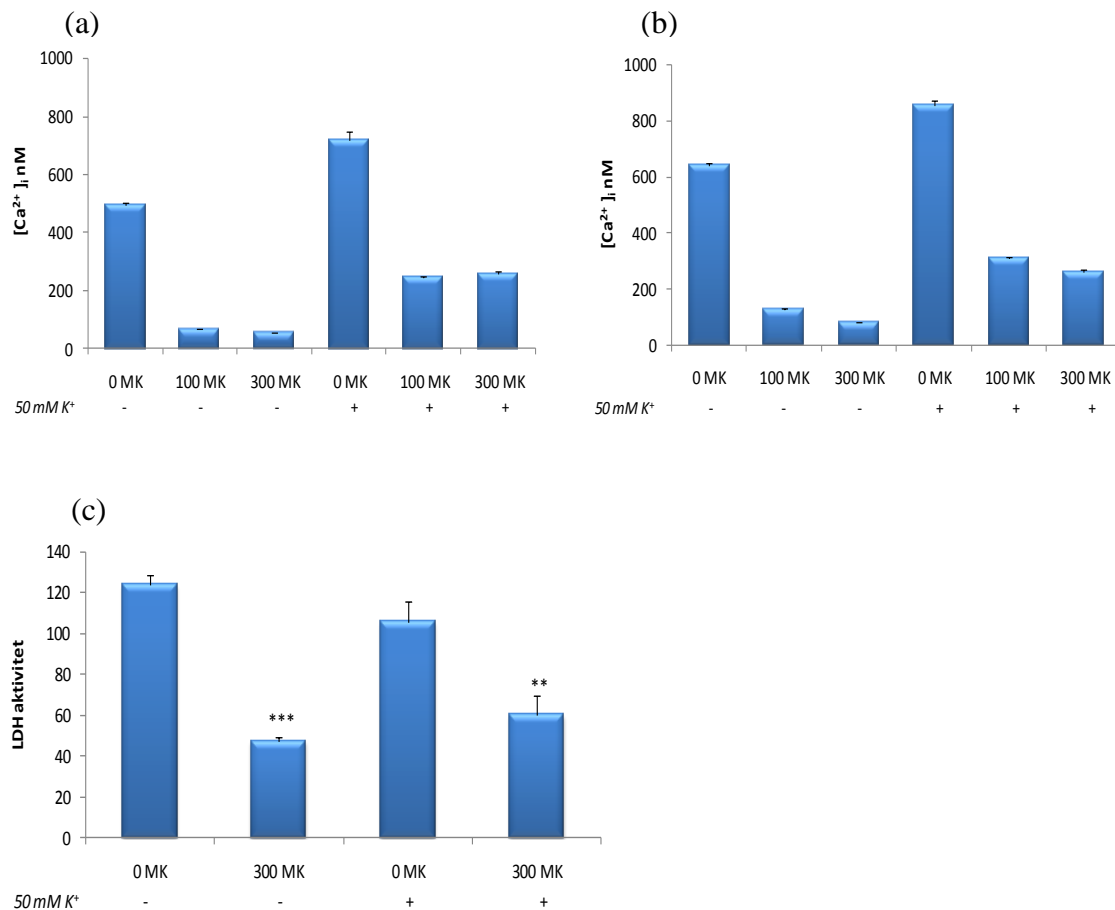
NMDAR ble aktivert med 500 μ M NMDA og glysin, men samtidig ble ionekanalene blokkert med MK-801. 50 mM K^+ og 10 μ M BayK ble anvendt til depolarisering, som ville gi Ca^{2+} -influks via HVA-kanalene og reversering av NCKX.

Effekten av Ca^{2+} -konsentrasjon i buffer på 3 mM og 10 mM ble sammenlignet.

Grunnen til at konsentrasjonen var på 10 mM, var at $[Ca^{2+}]_i$ skulle være så høy som mulig, men at Ca^{2+} -økningen ikke kom via NMDAR.

Figuren 3.32 viser at MK-801 kraftig reduserte NMDA-indusert Ca^{2+} -økning både med 3 mM og 10 mM Ca^{2+} ekstracellulært. Samme resultatet vises med K^{+} -depolarisering, selv om reduksjon i effekten ikke var like stor som uten depolarisering.

Figur 3.32 c viser at MK-801 beskytter mot celledød ved 10 mM Ca^{2+} og NMDA-aktivering med og uten K^{+} -depolarisering. Lignende resultat fikk vi ved 3 mM Ca^{2+} (ikke vist).



Figur 3.32 Effekt av MK-801 på $[\text{Ca}^{2+}]_i$ og toksisitet.

Cellene ble stimulert med 500 μM NMDA, og depolarisert med 50 mM K^{+} i kombinasjon med 10 μM BayK 8644. (a) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ med 3 mM Ca^{2+} i buffer; (b) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ med 10 mM Ca^{2+} i buffer, (c) toksisitet med 10 mM Ca^{2+} i buffer. Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. $n=8$. Signifikans ble testet mot 10 mM Ca^{2+} uten MK-801. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

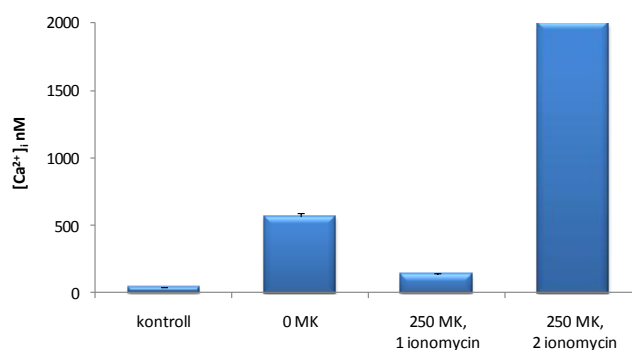
Det var uventet at MK-801 skulle redusere Ca^{2+} -nivå så mye ved K^{+} -depolarisering. Derfor var det uklart om MK-801 inhibisjon av celledød ved K^{+} -depolarisering skyldes at NMDAR-ione kanalen var blokkert eller om MK-801 reduserte den totale Ca^{2+} -nivået til for lav nivå (figur 3.32) for å kunne gi toksisitet (se diskusjon).

3.4.3 NMDA og MK-801 i kombinasjon med ionomycin

Ettersom MK-801 reduserte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ så kraftig ved depolarisering, ble det forsøkt å øke Ca^{2+} med ionomycin; det vil si undersøke effekten av ionomycin når man samtidig aktiverer NMDAR og blokkerer Ca^{2+} -influks via NMDAR. 500 μM NMDA og 20 μM glysin ble anvendt til å aktivere reseptoren, sammen med ione kanal-blokkering med 250 nM MK-801. Ionomycin konsentrasjon var 1-2 μM .

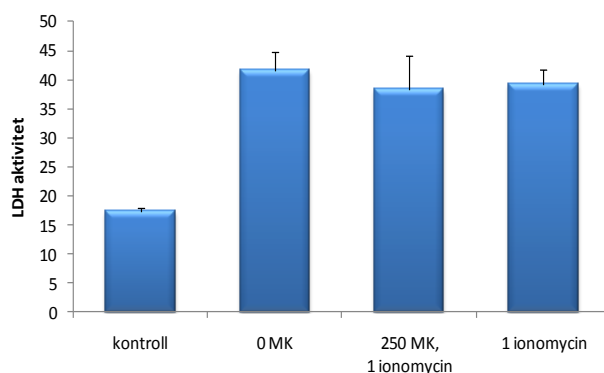
Figur 3.33 viser $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reduksjon med MK-801 og 1 μM ionomycin sammenlignet med bare NMDA. Høyere ionomycin konsentrasjon enn 1 μM førte til høy Ca^{2+} -overbelastning selv med MK-801 til stede.

Ionomycin toksisitet ble testet. Ionomycin viste høy celledød allerede ved en 1 μM , både med og uten MK-801 (figur 3.34).



Figur 3.33 Effekt av MK-801 på $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i rCGN ved lav og høy konsentrasjon av ionomycin.

Cellene ble stimulert med 500 μM NMDA og 3 mM Ca^{2+} , unntatt kontroll (0 NMDA, 1 mM Ca^{2+}). 250 MK = 250 nM MK-801; 1,2 ionomycin = 1 μM , 2 μM ionomycin. Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm SEM. n=8.



Figur 3.34 Ingen effekt av MK-801 på toksisitet i rCGN ved bruk av ionomycin.

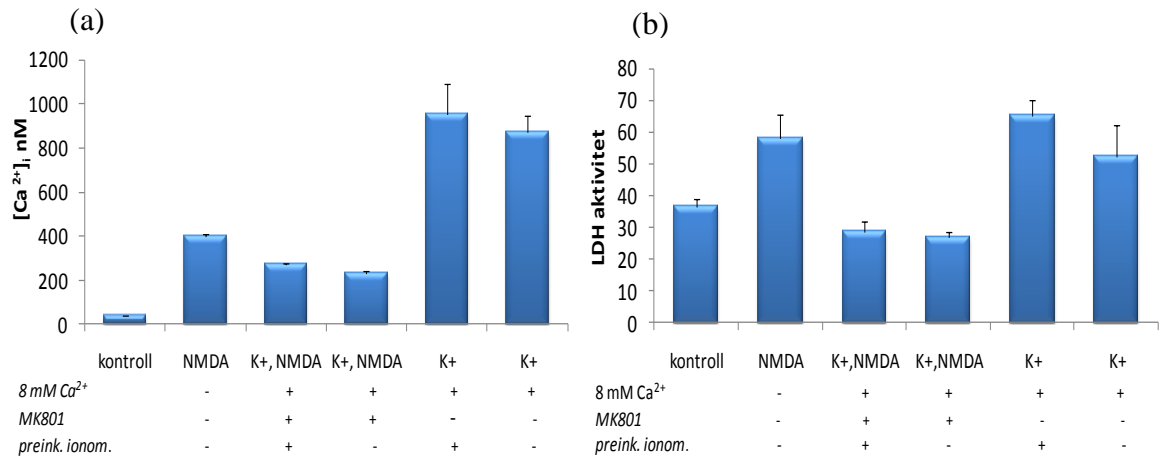
Cellene ble stimulert med 500 μM NMDA, unntatt kontroll og 1 μM ionomycin. 250 MK = 250 nM MK-801; 1 ionomycin = 1 μM ionomycin. Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm SEM. $n=8$.

3.4.4 NMDA og MK-801 med preinkubering og K^+ -depolarisering

Ettersom 1 μM ionomycin ga høy toksisitet når den var inkubert sammen med NMDA, ble det istedenfor testet å preinkubere cellene med ionomycin uten NMDA. Deretter ble cellene aktivert samtidig med NMDA og K^+ -depolarisering. Lavere konsentrasjon av ionomycin ble anvendt.

Målet var å undersøke om man får høy $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ved hjelp av ionomycin preinkubering og etterfølgende K^+ -depolarisering, med samtidig aktivering og blokkering av NMDAR. Konsentrasjon til MK-801 ble økt til 5 μM for å garantere blokkering av NMDAR ved depolarisering.

Figur 3.35 viser at K^+ -depolarisering med ionomycin preinkubering ga høy $[\text{Ca}^{2+}]_i$. NMDA sammen med MK-801 ga reduksjon i intracellulær Ca^{2+} , selv med 8 mM Ca^{2+} i buffer. Der Ca^{2+} -nivå var over 800 nM var det vist høy celledød (figur 3.35 b), antageligvis på grunn av Ca^{2+} -overbelastning (se diskusjon). Selv med denne protokollen ga MK-801 uventet inhibisjon av Ca^{2+} -økningen ved K^+ -depolarisering (sammenlign søylene 3 og 4 med 5 og 6 i figur 3.35).



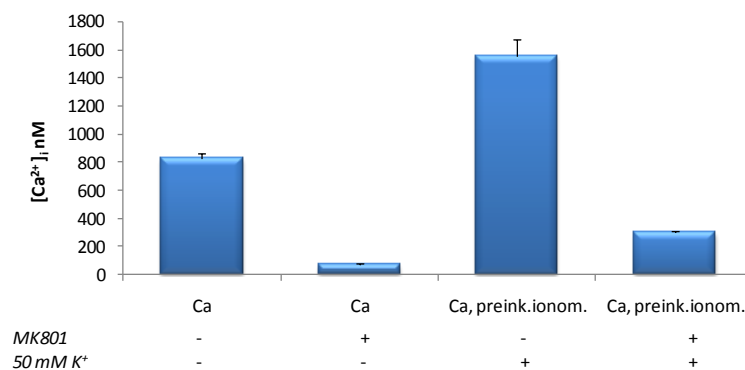
Figur 3.35 Effekt på (a) [Ca²⁺]_i og (b) toksisitet i rCGN.

NMDA = 500 µM NMDA med 3 Ca²⁺; preink.ionom.= preinkubering med 0,6 µM ionomycin.

K⁺ = 35 mM med 10 µM BayK 8644. MK-801 = 5 µM MK-801

Det virket som om MK-801 interfererte med K⁺-depolariseringsindusert Ca²⁺-influx (med NMDA til stede).

En separat studie ble utført med lavere MK-801 konsentrasjonen for å se om den fortsatt ga denne Ca²⁺-inhiberende effekt. Selv med bare 300 nM blokkerte MK-801 effekten til depolarisering (med og uten ionomycin preinkubering), se figur 3.36.



Figur 3.36 Effekt av MK-801 på [Ca²⁺]_i i rCGN. Cellene ble stimulert med 500µM NMDA.

[Ca²⁺] = 10 mM, [K⁺] = 50 mM, [MK-801] = 300 nM, [ionomycin] = preinkubering med 0,5 µM.

K⁺-depolarisering var i kombinasjon med 10 µM BayK 8644. Resultatene er vist som gjennomsnitt ± SEM. n=8.

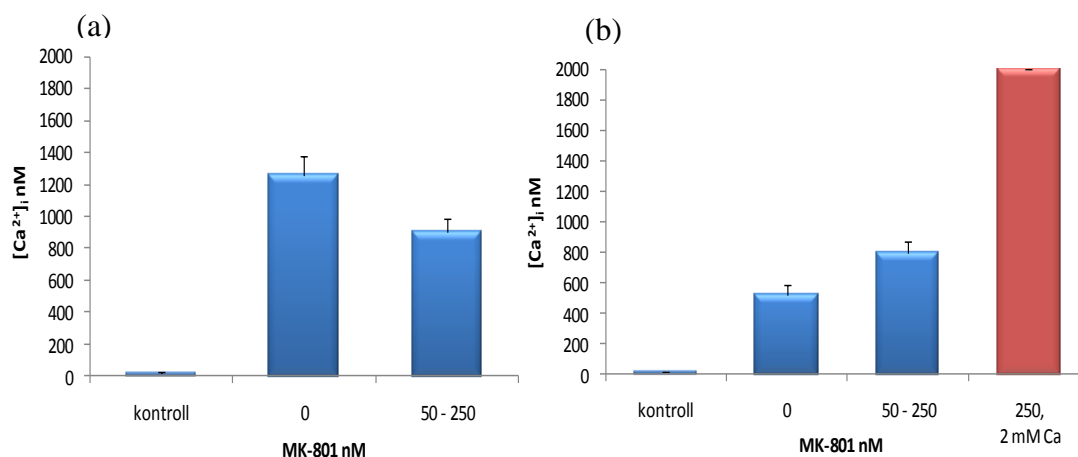
3.5 Test av interferens av ionekanalhemmere

På grunn av effekter MK-801 viste med K^+ -depolarisering og ionomycin i tidligere forsøk, var det viktig å teste om NMDAR-hemmeren interfererer med ionomycin og HVA-kanaler eller NCKX. I tillegg til rCGN ble også cellelinjen SH-SY5Y studert, fordi den ikke har NMDAR som kan påvirke resultatene.

3.5.1 MK-801 interferens med ionomycin i SH-SY5Y

Tidligere forsøk i rCGN viste problemer med ionomycin i intervallet 1-2 μM (figur 3.33). Det var mulig at MK-801 hadde en inhibisjonseffekt på ionomycin ved lavere konsentrasjon. SH-SY5Y ble anvendt for å teste dette, for å se om MK-801 ga samme effekter i denne modellen.

Det var stor variabilitet i $[\text{Ca}^{2+}]_i$ med MK-801 og ionomycin, men en inhibisjonseffekt ble ikke vist (resultatene var ikke signifikante), (figur 3.37).



Figur 3.37 Gjennomsnittlig $[\text{Ca}^{2+}]_i$ i SH-SY5Y med MK-801. Cellene ble stimulert med (a) 3 mM Ca^{2+} og 1 μM ionomycin (unntatt kontroll); (b) 1 mM Ca^{2+} og 2 μM ionomycin (unntatt kontroll). Kontroll for at $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kan gå høyt er vist i rødt med 2 mM Ca^{2+} / 2 μM ionomycin (med 250 nM MK-801). Resultatene er vist som gjennomsnitt \pm SEM. $n=8$.

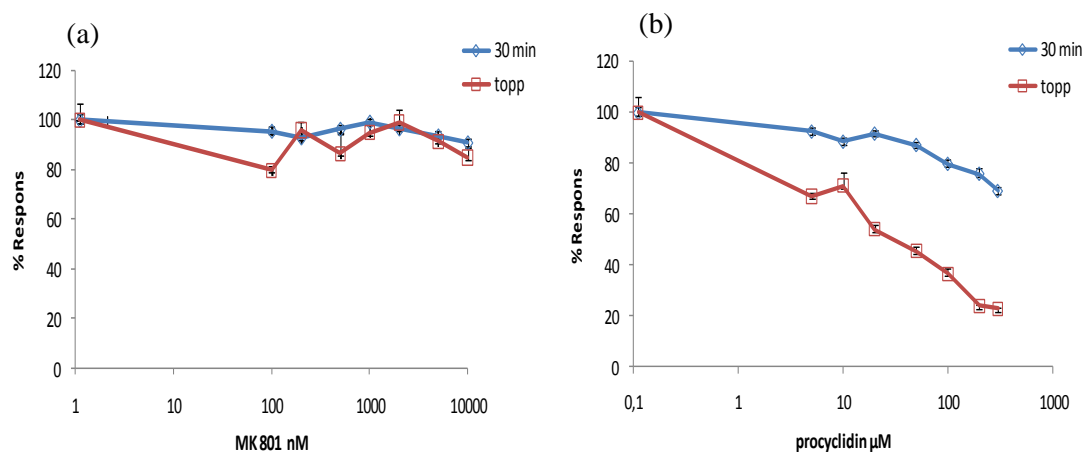
3.5.2 NMDAR - inhibitor-blokkering av Ca^{2+} -influks i SH-SY5Y

Siden NMDAR-blokkering er spenningsavhengig, bør konsentrasjonen til NMDAR inhibitorene økes, for å være sikker på at disse blokkerer reseptoren ved K^{+} -depolarisering. Men med så høye konsentrasjoner viste MK-801 en mulig interferens med HVA-kanaler eller NCKX. Effekten ble undersøkt i SH-SY5Y modellen som ikke har NMDAR. I tillegg til MK-801 ble en annen NMDAR antagonist anvendt; procyclidin.

Forsøk ble utført i modellene ”plate mode” og ”well mode”, hvor ”well mode” viser effekter på den tidlige responsen til K^{+} -depolarisering, det vil si ”topp” responsen (30 sek), mens ”plate mode” viser effekter over lengre tid (30 min).

Flere konsentrasjoner av hemmere ble anvendt; mellom 0-10 μM for MK-801 og 0-1000 μM for procyclidin.

Figur 3.38 viser at MK-801 ikke hadde noen effekt på depolariseringsindusert Ca^{2+} -influks, mens procyclidin hadde en inhibitorisk effekt.

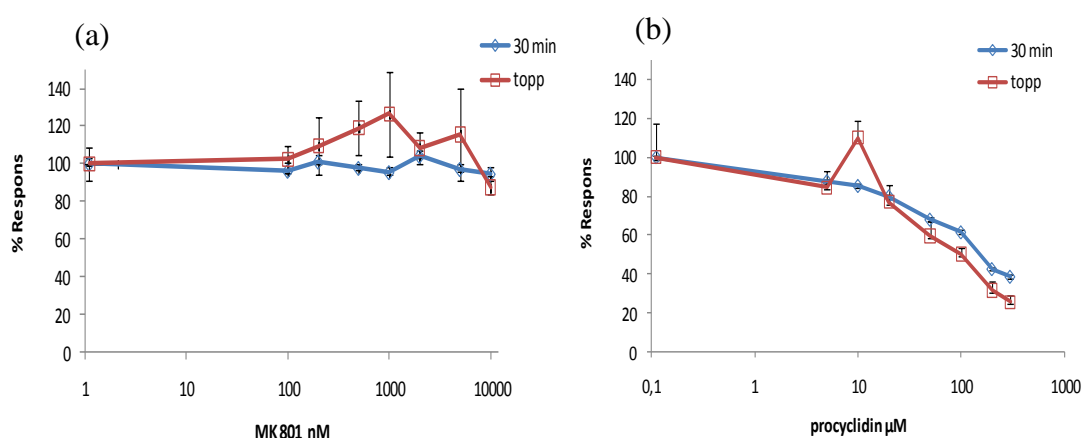


Figur 3.38 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vist som respons i cellelinjen SH-SY5Y med NMDA inhibitorer (a) MK-801 og (b) procyclidin. 30 min indikerer forsøk utført i ”plate mode” i 30 minutter, topp indikerer forsøk utført i ”well mode”, der initialresponsen ble målt. Resultatene vist i prosent \pm SEM, der 100 % er respons uten inhibisjon. $n=8$.

3.5.3 NMDAR-inhibitor-blokkering av Ca^{2+} -influks i rCGN

Da procyclidin hemmet K^{+} -depolarisert Ca^{2+} -influks i SH-SY5Y modellen, var det av interesse å teste om det var samme effekt i vår opprinnelige forsøksmodell, rCGN (figur 3.39).

Forsøkene ble utført i både ”plate mode” og ”well mode”. 10 μM DCKA og 500 μM APV ble brukt for å være sikker at NMDAR ikke var aktivert (NMDA og glysin ble ikke tilsatt).



Figur 3.39 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vist som respons i rCGN med NMDA inhibitorer (a) MK-801 og (b) procyclidin.

30 min indikerer forsøk utført i ”plate mode” i 30 minutter, topp indikerer forsøk utført i ”well mode”, der initialresponsen ble målt. Cellene ble tilsatt 10 μM DCKA og 500 μM APV. Resultatene vist i prosent \pm SEM, der 100 % er respons uten inhibisjon. n=8.

Resultatene viste det samme som med SH-SY5Y; procyclidin ga en inhiberende effekt på HVA- kanalene eller NCKX, mens MK-801 ikke hadde noen hemmende effekt (figur 3.39).

4 DISKUSJON

Hensikten med oppgaven var å karakterisere $[Ca^{2+}]_i$ -nivåer hos rCGN og sammenligne induisert toksisitet fra Ca^{2+} -overbelastning med NMDA-indusert toksisitet. Det ble studert gjennom å karakterisere ulike Ca^{2+} -influksveier; via NMDAR og veier som er uavhengige av NMDAR, for eksempel ved hjelp av K^+ -depolarisering.

Første metoden som ble anvendt var enkeltcelle imaging, for å karakterisere detaljene i økninger i $[Ca^{2+}]_i$. Forsøk med enkeltcelle imaging viste at økningene var homogene og uten kompliserte detaljer; hvilket gjorde det mulig å dra konklusjoner fra gjennomsnittet av mange responser. Metoden er tidskrevende og det er få paralleller som kan utføres per dag (5-6 forsøk). På grunn av disse utfordringer og konklusjonen at den gjennomsnittlige økningen av mange celler ga en god karakterisering av enkeltcelle responser, ble det gått over til metoden med plateleseren. Ved anvendelse av et 96-brønners brett har man flere paralleller og doser i en og samme batch celler (eventuelt automatiserte injeksjoner) på samme dag. Det betyr at man kan ta opp en hel dose-respons på samme batch. Hver måling i en brønn er et gjennomsnitt av tusentals av celler. Ulike muligheter for å få økt intracellulært Ca^{2+} ble testet ut; ionomycin, som direkte transporterer Ca^{2+} inn i cellen, K^+ -depolarisering, gjennom aktivering av HVA-kanaler og reversering av NCX, hemming av PMCA og Na^+/K^+ -ATPase og aktivering av AMPA/kainatreseptorer.

4.1 NMDA-mediert $[Ca^{2+}]_i$ -økning og toksisitet

Forsøk ble først utført parallelt på kornceller (CGN) fra både mus og rotte. Det ble funnet at mus generelt ga høyere nivåer i $[Ca^{2+}]_i$, men stort sett ga stoffene lignende effekter i begge. Ettersom mCGN ga høyere Ca^{2+} -nivåer (figur 3.2), ble det vanskeligere å skille mellom Ca^{2+} -overbelastning og den type celledød som er avhengig av glutamaterg stimulering, hvilken muligens ikke involverer Ca^{2+} -overbelastning. På grunn av dette og tekniske problemer med muskulturene, ble videre forsøk utført kun på kornceller fra rotte .

Generelt ga glutamat mer celledød enn NMDA. Et eksempel på dette er vist i figur 3.23, hvor 200 μM glutamat ga mer celledød enn 500 μM NMDA.

Glutamat aktiverer flere resptorer; metabotrope og ionotrope, bl.a.

AMPA/kainatreseptorer. Det var derfor interessant å sammenligne celledød av glutamat med celledød fra en kombinasjon av NMDA og kainat. Begge ga omtrent lik toksisitet (figur 3.22). Glutamatavhengig celledød går derfor sannsynligvis via flere reseptorer. Derfor ble det valgt å anvende NMDA og ikke glutamat når toksisitet skulle sammenlignes med Ca^{2+} -overbelastning.

200 μM NMDA ga ikke alltid signifikant og reproducerbar celledød. Det ble gitt en anbefaling om å øke NMDA konsentrasjon til 500 μM NMDA (Prof. Ann M. Marini, Bethesda, USA; personlig kommunikasjon). Med gjeldende toksisitetsprotokoll, 30 minutter inkubasjon med eksitotoksitets-stress og 24 timer rekonvalesens i en rekonvalesens buffer, fikk man ved 1 mM Ca^{2+} i buffer lite celledød, selv med 500 μM NMDA. Når ekstracellulært Ca^{2+} ble økt til 3 mM fikk man stabil reproducerbar toksisitet (figur 3.23). Derfor ble det valgt å benytte 500 μM NMDA, 3 mM Ca^{2+} i 30 minutter som referanse. Denne kombinasjon ga ikke maksimal celledød; med 6 og 10 mM Ca^{2+} i buffer var toksisiteten enda høyere (figur 3.31, 3.32 c). Det er mulig at dette var en kombinasjon av NMDA-indusert toksisitet og Ca^{2+} -overbelastning; derfor ble det bare anvendt 3 mM Ca^{2+} . Referanse for NMDA-indusert celledød var rundt 300 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figur 3.3); det vil si den intracellulære konsentrasjonen måtte være over 300 nM, for å kunne sammenlignes med NMDA-indusert toksisitet.

AMPA/kainatreseptor aktivering

Det ble forsøkt å få økt intracellulær Ca^{2+} via aktivering av AMPA/kainatreseptorer. Kainat nådde høye $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -nivåer, men ved blokkering av NMDAR og HVA-kanalene med MK-801 og verapamil ble effekten kraftig redusert (figur 3.15). Det betyr at den meste av Ca^{2+} -influxen etter kainatstimulering kommer indirekt via NMDAR og depolariseringsindusert influx. Selv med høye intracellulære Ca^{2+} -nivåer viste kainat liten effekt på toksisitet (figur 3.24b)

Det ble forventet høyere $[\text{Ca}^{2+}]_i$, da kainat kan stimulere glutamatfrigjøring som videre kan aktivere alle GluR.

4.2 Økning i $[Ca^{2+}]_i$ med preinkubering og K^+ -depolarisering

Det var ønskelig å øke $[Ca^{2+}]_i$, uavhengig av NMDAR. Ulike metoder ble studert og Ca^{2+} -økning ble karakterisert med ulike stoffer. Ionomycin var den første metoden som ble testet ut. For å ikke få interferenser med NMDAR, ble det først valgt å teste effekten på en human nevronal cellelinje, SH-SY5Y som ikke uttrykker NMDAR. Denne ga reproducerbare $[Ca^{2+}]_i$ -økninger som var avhengig av konsentrasjonen til ionomycin og ekstracellulær Ca^{2+} (figur 3.4). Lignende resultater ble vist i rCGN og mCGN. MK-801 ble anvendt, for å unngå indirekte aktivering av NMDAR. Med ionomycin og høy ekstracellulær Ca^{2+} -konsentrasjon kunne man nå høy $[Ca^{2+}]_i$ -nivå (over 1 μM), slik at det førte til Ca^{2+} -overbelastning (figur 3.27). 1.25 mM Ca^{2+} og ionomycin ga ikke høye toksisitetsnivåer; mens med 10 mM Ca^{2+} i buffer fikk man $[Ca^{2+}]_i$ over 2 μM og mye celledød. Det var vanskelig å kontrollere økningen i Ca^{2+} -nivåene med ionomycin. I en del forsøk med lav Ca^{2+} -konsentrasjon i buffer og høy ionomycin; kunne man få en langsom økning til høye $[Ca^{2+}]_i$ -nivåer i slutten av 30 minutters inkubasjon, hvor etter utvaskingen med standard buffer gikk cellene tilbake til sitt normale nivå. Resultatene var vanskelige å tolke og man kunne ikke trekke konklusjoner fra dette. Det ble derfor besluttet å benytte preinkubering med ionomycin til lavere stress nivåer av Ca^{2+} og derpå øke $[Ca^{2+}]_i$ med K^+ -depolarisering.

K^+ -depolarisering

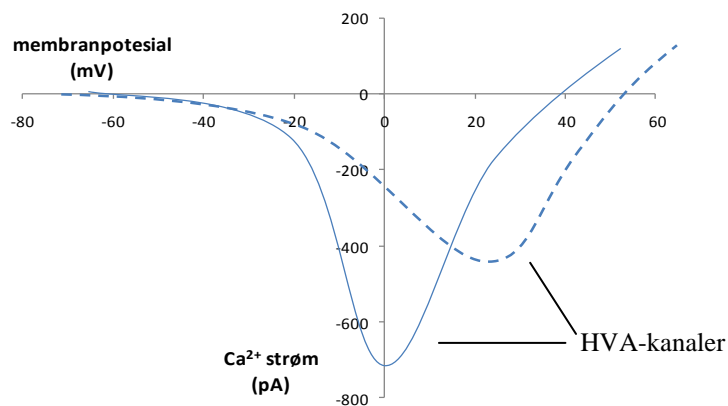
Med K^+ -depolarisering ble det testet ulike konsentrasjoner K^+ og Ca^{2+} , for å undersøke om $[Ca^{2+}]_i$ gikk til nivåer som var like høye som de man fikk med NMDA-stimulering. BayK 8644 (dihydropyridin derivat, forlenger åpningstiden til HVA-kanaler), ga en signifikant økning både i mCGN og rCGN (i kombinasjon med K^+ -depolarisering), (figur 3.7).

MK-801 ble anvendt også i dette tilfellet, for å unngå interferenser med NMDAR. Det var interessant at depolarisering med 35 mM K^+ ga nesten like høy $[Ca^{2+}]_i$ som 50 mM K^+ .

Det var en klar økning i $[Ca^{2+}]_i$ fra 1-6 mM ekstracellulær Ca^{2+} , mens forskjellen mellom 6-12 mM var liten. Generelt avhenger disse effektene av en selvbegrensende innstrømning av Ca^{2+} med depolarisering på grunn av egenskapene til HVA-kanaler. HVA-kanalene er mest effektive når depolariseringen ikke er for høy. Ved høy depolarisering blir den elektrokjemiske drivkraften for Ca^{2+} -influx redusert (figur 4.1). Ulike typer HVA-kanaler (P/Q, N, L, R) kan ha ulik kinetikk, slik at man får maksimal influx av Ca^{2+} ved ulik grad av depolarisering. Figur 4.1 viser eksempler på P-type (Mintz 1994) og en L-type karakteristikk (Hille 1992).

At $[Ca^{2+}]_i$ ikke øker noe vesentlig over 6 mM er mulig, på grunn av metning i HVA-kanalene. Det ble også vist at denne depolariserings-avhengige Ca^{2+} -influx generelt er en bidrag også ved NMDA-indusert Ca^{2+} -innstrømning (figur 3.9), det vil si ved NMDA stimulering går en del av Ca^{2+} -influx også via HVA-kanaler og NCKX.

Ved 6-12 mM ekstracellulær Ca^{2+} og 50 mM K^+ når man Ca^{2+} -nivåer som er like høye som med 500 μ M NMDA og 3 mM Ca^{2+} . Ettersom en del av NMDA stimulerende influx er gjennom HVA-kanaler og NCKX, er innstrømning gjennom NMDAR mindre enn det som gir 300 nM $[Ca^{2+}]_i$.



Figur 4.1 Strøm-spenning forhold til HVA-kanaler. Figuren viser at HVA-kanalene kan ha ulik karakteristikk; maksimal Ca^{2+} -influx fås ikke ved samme membranpotensial for ulike typer HVA-kanaler. Hel linje indikerer P-type kanaler mens stiptet linje indikerer L-type kanaler. Uansett vil i begge situasjoner, ved kraftig depolarisering, Ca^{2+} -innstrømning gå ned.

Ionomycin i kombinasjon med K^+ -depolarisering

Da $[Ca^{2+}]_i$ ved K^+ -depolarisering ikke nådde mye høyere enn NMDA-indusert $[Ca^{2+}]_i$, ble det prøvd å øke $[Ca^{2+}]_i$ ytterligere med K^+ -depolarisering i kombinasjon med andre stoffer. Som tidligere nevnt, dersom man når høye nivåer i $[Ca^{2+}]_i$, vil det gi Ca^{2+} -overbelastning og celledød, uavhengig av NMDAR. Dette var ikke målet med oppgaven. Interessen lå i å teste hypotesen at NMDA-indusert celledød ikke er avhengig av Ca^{2+} -overbelastning. Man ville øke $[Ca^{2+}]_i$ til cirka samme nivåer som ved NMDA-stress, men ikke til så høye nivåer at man garantert får $[Ca^{2+}]_i$ -overbelastning og celledød. Ionomycin preinkubering ble testet, hvilket viste at det var mulig å nå høye nivåer i $[Ca^{2+}]_i$ (figur 3.10). Grunnen til det er at preinkubering sannsynligvis fører til at Ca^{2+} -bufferne inne i cellen (inklusive mitokondrier og ER) blir mettet med Ca^{2+} . Dette vil da gi høyere $[Ca^{2+}]_i$ -nivåer ved stimulering. Med K^+ -depolarisering synes dette å stemme, da spesielt den initiale responsen fra K^+ -depolarisering nådde høye nivåer, over 800 nM (figur 3.12), og ble ytterligere økt med økt tid for preinkubering. Selv om den initiale responsen viste en rask nedgang (figur 3.13), ble det etter 30 minutter med depolarisering nådd høy $[Ca^{2+}]_i$ med relativ lav ionomycin (0,5 μM) i preinkubering.

Inhibisjon av Na^+/K^+ -ATPasen og PMCA

For å få økt intracellulært Ca^{2+} ble det prøvd å hemme Na^+/K^+ -ATPasen. Inhibisjon av ”pumpen” ville føre til en indirekt økning av Ca^{2+} intracellulært; i og med at utstrømningen av Na^+ er blokkert vil den cytoplasmiske konsentrasjonen øke. Dermed går NCX og NCKX langsommere og kan til og med gå i revers modus, slik at Na^+ strømmer ut av cellen og Ca^{2+} inn i cellen; avhengig av hvor kraftig cellen er depolarisert.

Inhibitoren, ouabain, ga uventede resultater; reduksjon i $[Ca^{2+}]_i$ -nivå ble observert i nærvær av glutamaterge agonister. Med bare ouabain var $[Ca^{2+}]_i$ økt som ventet. Det er interessant at tross at ouabain senket $[Ca^{2+}]_i$, ga den en signifikant økning i NMDA-indusert celledød. Dette kan være på grunn av feilregulering av Na^+ -homeostasen, ettersom Na^+/K^+ -ATPasen er den viktigste måten cellen kan fjerne Na^+ . Blokkering av enzymet kan føre til økt celledød.

Det er også mulig at forklaringen ligger i depolarisering av cellen - økt intracellulær Na^+ og redusert K^+ vil føre til at cellen depolariseres. Ved depolarisering uten NMDA vil HVA-kanalene og NCX øke Ca^{2+} -innstrømning og dermed $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

I nærvær av glutamaterge agonister, vil cellen allerede være depolarisert slik at HVA-kanalene allerede er mettet. Ca^{2+} -innstrømningen kan da bli redusert av ouabain effekten, som diskutert tidligere (se figur 4.1).

Siden ouabain ikke ga entydige resultater, var det interessant å undersøke effekten av PMCA hemmere, NaV og CE, for å se om disse ville gi økt $[\text{Ca}^{2+}]_i$. NaV ga ingen betydelig effekt gitt sammen med ouabain. NaV anvendt alene, resulterte i en økning i intracellulær Ca^{2+} , selv om effekten var liten.

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ ble ikke økt med inhibatoren CE; i nærvær av NMDA ble $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signifikant redusert. Det var vanskelig å finne en forklaring for denne effekten.

PMCA er en pumpe med høy affinitet for Ca^{2+} men har lav transport kapasitet. Det betyr at pumpen ikke fjerner store mengder Ca^{2+} , men er mest effektiv i å vedlikeholde lave konsentrasjoner i cytosolisk Ca^{2+} i cellen. Det er derfor rimelig at ved blokkering av PMCA, får man ingen betydelig økning i $[\text{Ca}^{2+}]_i$ når intracellulær Ca^{2+} allerede er høy. NCX derimot, binder ikke Ca^{2+} like effektivt (har lav affinitet), men har høy kapasitet. Derfor behøves det en høy Ca^{2+} -konsentrasjon for at utbytteren skal være effektiv. Den spiller dermed en viktig rolle i å gjenvinne cellens normale $[\text{Ca}^{2+}]$, for eksempel etter eksitotoksisk stress. En mulig vei å få økt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ville være å hemme NCX. Det var dessverre ikke mulig å få tak i en NCX inhibitor som ikke var autofluoreserende og kunne brukes med fura-2; slik at denne muligheten å få økt Ca^{2+} intracellulært ikke var anvendbar.

NCX og NCKX vil sannsynligvis gå i revers modus ved K^+ -depolarisering og bidra til økt $[\text{Ca}^{2+}]_i$; det har derfor ingen hensikt å blokkere transportørene. (Til nå finnes det ingen spesifikk hemmer for revers modus av NCKX.)

4.3 Ca^{2+} -overbelastning er ikke årsak til NMDA-indusert celledød

Kaliumindusert Ca^{2+} -influks gir ikke celledød

Man nådde ikke høy toksisitet selv med 50 mM K^+ og 6 mM Ca^{2+} i buffer i nærvær av MK-801 (figur 3.28). Dette indikerer at celledød ved NMDAR-stimulering ikke er direkte relaterbar til Ca^{2+} -overbelastning. Om Ca^{2+} -overbelastning var årsaken til celledød, ville K^+ -depolarisering også gitt høy toksisitet, men det ga ingen signifikant økt celledød over kontroll. Figur 3.36 viser at med kombinasjon - preinkubering, K^+ -depolarisering, NMDA og høy Ca^{2+} i buffer, når man høye $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -nivåer. Selv med bare ionomycin kan man få toksiske konsentrasjoner av intracellulær Ca^{2+} , se for eksempel figur 3.27. Likeså ser man høye $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -nivåer og celledød med kombinasjonen NMDA og K^+ -depolarisering i figur 3.32. I disse tilfellene kan det ikke utelukkes at toksisiteten er delvis på grunn av Ca^{2+} -overbelastning.

Det var interessant at NMDA-indusert celledød ved lavere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -nivåer også er Ca^{2+} -avhengig (figur 3.23). Det betyr muligens at toksisiteten er avhengig av Ca^{2+} -influks gjennom NMDAR. Konklusjonen støttes av andre resultater hvor eksitotoksitet ble studert i nerveceller (Tymianski et al. 1993, Sattler et al. 1998). Men man kan ikke direkte dra denne konklusjonen, for det kan finnes alternative forklaringer.

Først, Na^+ -influks ble sammenlignet med ulike stimulasjoner (figur 3.21). NMDA-stimulering (i tillegg til andre glutamaterge agonister) og K^+ -depolarisering resulterte i forskjellige intracellulære Na^+ -økninger; hvor NMDA, glutamat og kainat ga økt $[\text{Na}^+]_i$, noe som ikke var tilfellet med K^+ -depolarisering. Det er derfor mulig at ved NMDAR stimulering gir feilregulering av Ca^{2+} og Na^+ tilsammen forandringer/forstyrrelser i metabolismen, hvilket igjen kan føre til at cellen går i apoptose/nekrose.

Det er derimot interessant at OGD ikke hadde noen stor effekt på toksisitet (figur 3.25), mens ouabain (metabolsk hemmer av Na^+/K^+ -ATPase) ga økt celledød i kombinasjon med NMDA og glutamat. Dette er en indikasjon på at en høy Na^+ -belastning muligens kan ha en betydning for toksisitet.

En annen mulighet kan være at celldøden induseres av et lokalt høyt Ca^{2+} -nivå (lokalisert ved membranen, i nærheten av den intracellulære siden av NMDAR) som ikke nås ved aktivering av andre veier.

I det siste tilfellet betyr det at de gjennomsnittlige Ca^{2+} -nivåene man måler med fura-2 i cytoplasma ikke er relevante for NMDA-indusert toksisitet. Det må bemerkes at selv med denne tolkningen er konklusjonen korrekt, det vil si at det ikke er cellens Ca^{2+} -overbelastning som førte til celledød ved NMDA-stimulert Ca^{2+} -økning, der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ er under 500 nM.

Toksisitet ved aktivering av NMDAR med blokkert ioneinfluks

I forsøk som ble diskutert ovenfor, ble $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -økning og toksisitet sammenlignet der man hovedsakelig enten aktiverte NMDAR eller aktiverte Ca^{2+} -influks via andre veier. Ettersom det er mulig (som diskutert ovenfor) at det er den lokale Ca^{2+} -konsentrasjon ved NMDAR på innsiden av membranen som er avgjørende for toksisitet, var det interessant å forsøke å klargjøre om den lokale $[\text{Ca}^{2+}]$ ved NMDAR kan gi toksisitet når NMDAR er aktivert med agonister (NMDA eller glutamat). Om den er aktivert, ville toksisiteten være avhengig av Ca^{2+} -innstrømning, eller er det nok med et høyt Ca^{2+} -nivå?

I tidligere delen av oppgaven, ble betydningen av Ca^{2+} -overbelastning studert, når NMDAR ikke var aktivert. I den senere delen av studien ble Ca^{2+} -økning og toksisitet undersøkt med en lignende protokoll som tidligere, men med den forskjellen at NMDAR nå var aktivert med NMDA og glysin, men samtidig ble ioneinnstrømningen blokkert med en ikke-kompetitiv ione kanalhemmer ved tilstrekkelig høy konsentrasjon, for å blokkere NMDAR-ione kanalen selv ved K^+ -depolarisering.

Først ble det anvendt GK11 som en inhibitor av Ca^{2+} -innstrømning. GK11 var interessant, da den er i klinisk utprøving som medikament for å forhindre eksitotoksisitet ved ryggmargsskade (Hawryluk et al. 2008), og er mindre toksisk enn MK-801 (Hirbec et al. 2001; Vandame et al. 2007). GK11 ga en reduksjon av NMDA-indusert celledød (figur 3.29), men var for spenningsavhengig (figur 3.30); den ga ikke pålitelig blokkering ved K^+ -depolarisering. Derfor ble det i videre studier brukt den mest potente NMDAR-hemmeren; MK-801.

Initialt ble det anvendt 100-300 nM MK-801, hvilke er rimelige konsentrasjoner for å kunne blokkere NMDAR ved NMDA stimulering. Ved samtidig kraftig depolarisering, for eksempel med 50 mM K^+ , er ikke-kompetitive ionekanalhemmere mindre effektive, på grunn av spenningsavhengig dissosiasjon av inhibitorene fra ionekanalene (etterligner den fysiologiske funksjonen til Mg^{2+} blokkering).

Ettersom studiene ble utført med 500 μ M NMDA (preinkubering med ionomycin) og 35-50 mM K^+ -depolarisering, er det åpenbart at cellene blir kraftig depolariserte. Derfor var det nødvendig å øke konsentrasjonen til NMDAR- hemmere; hvor det i disse studier ble anvendt 5 μ M MK-801.

Studiene viste en uventet interferens mellom MK-801 og K^+ -depolariserings-indusert influks, hvilket viste seg som redusert $[Ca^{2+}]_i$ - nivå og redusert celledød, når det ble brukt høy MK-801 konsentrasjon med NMDA (figur 3.35).

Interferensen kunne man se allerede med lavere MK-801 konsentrasjon (figur 3.32). I disse forsøk var NMDA og glysin tilsatt samtidig med K^+ -depolarisering og MK-801. Selv om det ble anvendt 10 mM Ca^{2+} , fikk man ingen celledød. Men, det viste seg at resultatet ikke var entydig ettersom $[Ca^{2+}]_i$ - nivået uventet var mye redusert. Derfor kan man ikke konkludere at blokkeringen av Ca^{2+} -influks gjennom NMDAR inhiberte toksisitet. Det kan være at man ikke fikk høy nok Ca^{2+} i cytosol gjennom de andre veiene. Det virker som om MK-801 allerede ved 300 nM hindrer eller påvirker Ca^{2+} -influks via HVA-kanalene eller NCKX.

Det ble derfor gjennomført en separat studie av eventuell blokkering av HVA-kanaler med ikke-kompetitive hemmere, for eventuelt finne alternative inhibitorer som ikke interfererer med HVA-kanaler. Det ble vist at inhibitoren procyclidin hemmet K^+ -depolarisert influks ved høyere konsentrasjoner, både i SH-SY5Y, som ikke har NMDAR, men også i rCGN. MK-801 derimot, viste ingen signifikant inhibisjonseffekt, verken i SH-SY5Y eller rCGN (opp til 10 μ M). I rCGN ble NMDAR blokkert med APV og DCKA; NMDA og glysin var ikke tilsatt, og det forventes derfor at NMDAR var helt inaktivert i disse testene av interferens med ionekanalinhhibitorene.

Det var vanskelig å finne en forklaring på hvorfor MK-801 blokkerte K^+ -depolariseringsindusert Ca^{2+} -influks, når NMDAR var aktivert. Det er mulig at interferensen er via NCX/NCKX. Dermed kunne man ikke komme til noen konklusjon når det gjelder differensiering mellom de ulike hypotesene – det vil si får man NMDA avhengig toksisitet på grunn av ioneinnstrømning gjennom NMDAR, eller er den kun avhengig av en høy Ca^{2+} -konsentrasjon sammen med en aktivert NMDAR. Tidligere konklusjon (se oppe) påvirkes ikke av dette; det innebærer at Ca^{2+} -overbelastning ikke er grunnen til NMDA-indusert toksisitet hos rCGN ved 500 μM NMDA, 1-3 mM Ca^{2+} i buffer.

Mulig forklaring på kontroversielle rapporter om NCX betydning

I litteraturen er det rapportert motsiende konklusjoner om effekten av NCX-blokade ved eksitotoksisk stress. Noen studier (Kiedrowski et al. 2004; Li et al. 2000; Imahashi et al. 2005) konkluderte at blokkering reduserte celledød, mens andre (Hoyt et al. 1998; Pignataro et al. 2004; Bano et al. 2005) konkluderte det motsatte.

Med våre funn finnes en enkel forklaring til de motsiende rapportene: ved kraftig stress, for eksempel ved hjerneslag som gir en kombinasjon av lav ATP, høy ekstracellulær K^+ og økt glutamat, er cellen kraftig depolarisert. $[Na^+]_i$ er dermed høy og NCX og NCKX kan antas å gå i revers modus. I denne situasjon gir blokkering av NCX og NCKX delvis beskyttelse.

Derimot, ved moderat depolarisering kan man fra våre resultater dra konklusjonen at man får eksitotoksisk stress med relativ lav $[Ca^{2+}]_i$. Da er NMDAR er den kontrollerende aktøren og gir apoptotiske signaler, som ikke involverer Ca^{2+} -overbelastning. Under slike forhold operer NCX og NCKX fortsatt i normal modus, og inhibisjon av transportørene fører da til høyere $[Ca^{2+}]_i$ og økt celledød.

4.4 Forslag til videre studier

Som følge av flere utfordringer som ble møtt i denne oppgaven; MK-801, ionomycin, er det interessant å fortsette å studere mulige Ca^{2+} -influksveier for å øke $[\text{Ca}^{2+}]_i$, da det er av generell interesse og har en klinisk relevans (for eksempel ved hjerneslag og epilepsi).

Siden man fikk upålitelige resultater med ionomycin (når den ikke ble brukt som preinkubering), kan man prøve å teste $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -økning sammen med celledød, ved forskjellige kombinasjoner av ionomycin og ekstracellulær Ca^{2+} ; øke ionomycin men redusere Ca^{2+} -konsentrasjon og omvendt.

En annen mulighet ville være å anvende en annen Ca^{2+} -ionofor, for eksempel A23187; hvilket muligens ikke viser konsentrasjonrelaterte problemer som ionomycin. Det kan også tenkes å anvende ionomycin og A23187 i kombinasjon; i lave konsentrasjoner; i preinkubering. Kombinasjonen ville kanskje vise en mer lineær økning i $[\text{Ca}^{2+}]_i$ istedenfor supralineær.

Videre kan det testes å inhibere NCX, i tillegg til NCKX, slik at Ca^{2+} ikke kan strømme ut av cellen, for eksempel gjennom å fjerne extracellulær Na^+ (erstatte med for eksempel kolinklorid eller litium).

En annen metode for å øke $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kunne være å anvende NMDA-indusert Ca^{2+} -innstrømning, men i subtoksiske nivåer (øke Ca^{2+} til ca. 100 nM), i tillegg til å øke Ca^{2+} via en annen vei, for eksempel K^+ -depolarisering med BayK 8644.

4.5 Konklusjon

- $[Ca^{2+}]_i$ -økning i rCGN fra glutamatstimulasjon resulterer fra signifikante bidrag fra flere ione kanaler: NMDAR, AMPA/ kainat reseptorer og HVA-kanaler.
- Kainat gir $[Ca^{2+}]_i$ -økning hovedsakelig mediert via NMDAR og HVA-kanaler.
- En modell for glutamaterg-avhengig toksisitet ble etablert: 500 μ M NMDA, 3 mM Ca^{2+} , inkubasjonstid 30 minutter, og rekonvalesens i 24 timer.
- 200-300 μ M NMDA gir maksimal $[Ca^{2+}]_i$ -respons men lite og ikke reproducerbar toksisitet.
- $[Ca^{2+}]_i$ -økning ved toksiske nivåer av NMDA var forholdsvis lave, 300-400 nM.
- Det ble etablert en protokoll for å øke $[Ca^{2+}]_i$ via alternative influksveier (ikke via NMDAR): preinkubering med ionomycin med påfølgende K^+ -depolarisering.
- $[Ca^{2+}]_i$ -respons via NMDAR-uavhengig Ca^{2+} -influks som ikke var høyere enn den fra NMDA (< 500 nM), ga ikke toksisitet. Det ble konkludert at den NMDA-induserte toksisiteten ikke var assosiert med Ca^{2+} -overbelastning.
- Høye $[Ca^{2+}]_i$ kan gi celledød, uavhengig av NMDAR, på grunn av Ca^{2+} -overbelastning.
- Hemming av PMCA eller Na^+/K^+ -ATPasen hadde ingen effekt på maksimal $[Ca^{2+}]_i$ respons, men inhibisjon av Na^+/K^+ -ATPasen ga signifikant økt celledød.
- Ved aktivert NMDAR med samtidig blokkering av NMDAR-ione kanalen ble det funnet en interferens av MK-801 med $[Ca^{2+}]_i$ -økningen ved K^+ -depolarisering som ikke kan forklares av blokkaden av HVA-kanaler.

LITTERATURLISTE

Aarts M.M., Tymianski M. (2004) Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons. *Curr Mol Med* **4**, 137-147.

Albers R.W., Siegel G.J. (2006) Membrane Transport in *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 7th edition (Siegel G.J., Albers R.W., Brady S.T., Price D.L. eds) pp73-94. Elsevier Academic Press, London.

Arundine M., Tymianski M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* **34**, 325-337.

Arundine M., Tymianski M. (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* **61**, 657-668.

Bano D., Young K.W., Guerin C.J., Lefevre R., Rothwell N.J., Naldini L., Rizzuto R., Carafoli E., Nicotera P. (2005) Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* **120**, 275-285.

Berridge M.J. (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling *J Physiol* **499**, 291-306.

Berridge M.J., Bootman M.D. (1996) Calcium signaling in *Signal Transduction* (Heldin C.H., Purton M., eds), pp 205-221. Chapman & Hall, London.

Besancon E., Guo S., Lok J., Tymianski M., Lo E.H. (2008) Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 268-275.

Biedler J.L., Helson L., Spengler B.A. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* **33**, 2643-2652.

Biedler J.L., Roffler-Tarlov S., Schachner M., Freedman L.S. (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* **38**, 3751-3757.

Bootman M.D., Collins T.J., Peppiatt C.M., Prothero L.S., MacKenzie L., De Smet P., Travers M., Tovey S.C., Seo J.T., Berridge M.J., Ciccolini F., Lipp P. (2001) Calcium signalling-an overview. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 3-10.

Boulland J., Levy L.M. (2005) Glutamat, glutamin og iskemi i sentralnervesystemet. *Tidsskr Nor Lægeforen* **125**, 1479-1481.

Braitenberg V., Schüz A. (1998) *Cortex: Statistics and Geometry of Neuronal Connectivity*, 2nd edition. Springer, Berlin.

- Brown G.C. (2010) Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* **23**, 153-165.
- Bruno V, Battaglia G, Copani A et al (1995) Activation of class II or III metabotropic glutamate receptors protects cultured cortical neurons against excitotoxic degeneration. *Eur J NeuroSci* **7**, 1906–1913.
- Catterall W.A., Perez-Reyes E., Snutch T.P., Striessnig J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* **57**, 411-425.
- Chatterton J.E., Awobuluyi M., Premkumar L.S., Takahashi H., Talantova M., Shin Y., Cui J., Tu S., Sevarino K.A., Nakanishi N., Tong G., Lipton S.A., Zhang D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**, 793-798.
- Chavis P., Shinozaki H., Bockaert J. (1994) The metabotropic glutamate receptor types 2/3 inhibit L-type calcium channels via a pertussis toxin-sensitive G-protein in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci* **14**, 7067–7076.
- Choi D.W. (1985) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* **58**, 293–297
- Choi D.W. (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* **7**, 369–379.
- Choi D. W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623-634.
- Dawson V.L., Dawson T.M., London E.D. (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 6368–6371.
- Di Virgilio F., Steinberg T.H., Silverstein S.C. (1990) Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers. *Cell Calcium* **11**, 57-62.
- Dong X.X., Wang Y., Qin Z.H. (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* **30**, 379-387.
- Frandsen A., Schousboe A. (1990) Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *Int J Dev Neurosci* **8**, 209-216.
- Frerking M., Schmitz D., Zhou Q. (2001) Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3→CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *J Neurosci* **21**, 2958–2966.
- Galione A., Petersen O.H. (2005) The NAADP receptor: new receptors or new regulation? *Mol Interv* **5**, 73-79.

Gallo V., Ciotti M.T., Coletti A., Aloisi F., Levi G. (1982) Selective release of glutamate from cerebellar granule cells differentiating in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7919-7923.

Ghez C. (1991) The cerebellum in *Principles of neural sciences*, 3rd edition (Kandel E.R., Schwartz J.H., eds) pp 626-646. Elsevier, New York.

Ginsberg M.D. (2008) Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* **55**, 363-389.

Green AR, Shuaib A. (2006) Therapeutic strategies for the treatment of stroke. *Drug Discov Today* **11**, 681-693.

Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450.

Hara M.R, Agrawal N., Kim S., Cascio M.B., Fujimuro M., Ozeki Y., Takahashi M., Cheah J.H., Tankou S.K., Hester L.D., Ferris C.D., Hayward S.D., Snyder S.H., Sawa A. (2005) S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol* **7**, 665–674.

Hardingham G.E. (2009) Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans* **37**, 1147-60.

Hassel B., Dingledine R. (2006) Glutamate in *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 7th edition (Siegel G.J., Albers R.W., Brady S.T., Price D.L.eds) pp 267-290. Elsevier Academic Press, London.

Hawryluk G.W.J, Rowland J., Kwon B.K., Fehlings M.G. (2008) Protection and Repair of the Injured Spinal Cord: A Review of Completed, Ongoing, and Planned Clinical Trials for Acute Spinal Cord Injury. *Neurosurg Focus* **25**, 1-16.

Heilbrunn L.V., Wiercinsky F.J. (1947) Action of various cations on muscle protoplasm. *J. Cell Comp. Physiol* **19**, 15–32.

Hewavitharana T, Deng X, Soboloff J, Gill DL. (2007) Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium* **42**, 173-182.

Hogberg H.T., Kinsner-Ovaskainen A., Hartung T., Coecke S., Bal-Price A.K. (2009) Gene expression as a sensitive endpoint to evaluate cell differentiation and maturation of the developing central nervous system in primary cultures of rat cerebellar granule cells (CGCs) exposed to pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol* **235**, 268-286.

Hollmann M., Hartley M., Heinemann S. (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* **252**, 851-853.

Hille B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd edition. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.

Hirbec H., Gaviria M., Vignon J. (2001) Gacyclidine: a new neuroprotective agent acting at the N-methyl-D-aspartate receptor. *CNS Drug Rev* **7**, 172-198.

Hoyt K. R., Arden S. R., Aizenman E., Reynolds I. J. (1998) Reverse Na⁺/Ca²⁺ exchange contributes to glutamate-induced intracellular Ca²⁺ concentration increases in cultured rat forebrain neurons. *Mol. Pharmacol* **53**, 742-749.

Imahashi K., Pott C., Goldhaber J.I., Steenbergen C., Philipson K.D., Murphy E. (2005) Cardiac-specific ablation of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* **97**, 916-921.

Invitrogen by Life Technologies

http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Drug-Discovery/Target-and-Lead-Identification-and-Validation/g-protein_coupled_html/cell-based-second-messenger-assays/Fura-2-calcium-indicator.html (Lest dato 01.07.2010)

Jacobs C.M., Aden P., Mathisen G.H., Khuong E., Gaarder M., Løberg E.M., Lømo J., Maehlen J., Paulsen R.E. (2006) Chicken cerebellar granule neurons rapidly develop excitotoxicity in culture. *J Neurosci Methods* **156**, 129-135.

Kao J.P.Y. (1994) Practical aspects of measuring [Ca²⁺] with fluorescent indicators, in *Methods in cell biology: A practical guide to the study of Calcium in living cells* (Nuccitelli R., ed.), pp 155-181. Academic Press Inc., San Diego, USA.

Kawasaki H., Nakayama S., Kretsinger R.H. (1998) Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals* **11**, 277-295.

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.

Kiedrowski, L., Czyz, A., Baranauskas, G., Li, X. F., Lytton, J. (2004) Differential contribution of plasmalemmal Na⁺/Ca²⁺ exchange isoforms to sodium-dependent calcium influx and NMDA excitotoxicity in depolarized neurons. *J Neurochem* **90**, 117-128.

Koh J.Y., Choi D.W. (1987) Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods* **20**, 83-90.

Lambert D.G., Ghataore A.S., Nahorski S.R. (1989) Muscarinic receptor binding characteristics of a human neuroblastoma SK-N-SH and its clones SH-SY5Y and SH-EP1. *Eur J Pharmacol* **165**, 71-77.

Lambert D.G., Wojcikiewicz R.J., Safrany S.T., Whitham E.M., Nahorski S.R. (1992) Muscarinic receptors, phosphoinositide metabolism and intracellular calcium in neuronal cells. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **16**, 253-270.

- Lau A., Tymianski M. (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* **460**, 525-542.
- Leist M, Nicotera P. (1998) Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res* **239**, 183-201.
- Li S., Jiang Q., Stys P.K. (2000) Important role of reverse Na(+)-Ca(2+) exchange in spinal cord white matter injury at physiological temperature. *J Neurophysiol* **84**, 1116-1119.
- Li Z., Matsuoka S. (1994) Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane NCX *J Biol Chem* **269**, 17434–17439.
- Llinas R.R., Walton K.D., Lang E.J. (2004) Cerebellum In *The Synaptic Organization of the Brain* (Shepherd G.M. eds) Oxford University Press, New York.
- Lipton S.A. (2004) Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx* **1**, 101-110.
- Chen H.S., Lipton S.A. (2006) The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* **97**, 1611-1626.
- Lukas R.J., Norman S.A., Lucero L. (1993) Characterization of nicotinic acetylcholine receptors expressed by cells of the SH-SY5Y human neuroblastoma clonal line. *Mol Cell Neurosci* **4**, 1-12.
- MacDonald B.K., Cockerell O.C., Sander J.W., Shorvon S.D. (2000) The incidence and lifetime prevalence of neurological disorders in a prospective community-based study in the UK. *Brain* **123**, 665–676.
- Marini A.M., Spiga G., Mocchetti I. (1997) Toward the development of strategies to prevent ischemic neuronal injury. In vitro studies. *Ann N Y Acad Sci* **825**, 209-219.
- Martínez-Sánchez M., Striggow F., Schröder U.H., Kahlert S., Reymann K.G., Reiser G. (2004) Na(+) and Ca(2+) homeostasis pathways, cell death and protection after oxygen-glucose-deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience* **128**, 729-740.
- Mattson M.P., Bazan N.G. (2006) Apoptosis and Necrosis in *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 7th edition (Siegel G.J., Albers R.W., Brady S.T., Price D.L.eds) pp 603-615. Elsevier Academic Press, London.
- McNamara D., Smith E.C., Calligaro D.O., O'Malley P.J., McQuaid L.A., Dingledine R. (1990) 5,7-Dichlorokynurenic acid, a potent and selective competitive antagonist of the glycine site on NMDA receptors. *Neuroscience Letters* **120**, 17-20.
- Minta A., Tsien R.Y. (1989) Fluorescent indicators for cytosolic sodium. *J Biol Chem* **264**, 19449–19457.

- Mintz I.M. (1994) Block of Ca channels in rat central neurons by the spider toxin omega-Aga-IIIa. *J Neurosci* **14**, 2844-2853.
- Morris R.G. (1989) Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *Journal of Neuroscience* **9**, 3040-3057.
- Murray J.B. (2002) Phencyclidine (PCP): a dangerous drug, but useful in schizophrenia research. *J Psychol* **136**, 319-327.
- Nuccitelli R. (1994) *Methods in cell biology: A practical guide to the study of Calcium in living cells*. Academic Press Inc., San Diego, USA.
- Okada Y., Sato K., Numata T. (2009) Pathophysiology and puzzles of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel. *J Physiol* **587**, 2141-2149.
- Olney J.W. (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**, 719-721.
- Olney J. W. (1986) Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Adv Exp Med Biol* **203**, 631-64
- Pendlebury S.T, Rothwell P.M., Algra A., Ariesen M.J., Bakac G., Czlonkowska A., Dachenhausen A., Krespi Y., Körv J., Krolkowski K., Kulesh S., Michel P., Thomassen L., Bogousslavsky J., Brainin M. (2004) Underfunding of stroke research: a Europe-wide problem. *Stroke* **35**, 2368–2371.
- Pignataro G., Tortiglione A., Scorziello A., Giaccio L., Secondo A., Severino B., Santagada V., Caliendo G., Amoroso S., Di Renzo G., Annunziato L. (2004) Evidence for a protective role played by the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion in male rats. *Neuropharmacology* **46**, 439-48.
- Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Moore P.K. (2003) *Pharmacology*, 5th edition. Churchill Livingstone, London.
- Ring A., Tanso R. (2007) Measurements with fluorescent probes in primary neural cultures; improved multiwell techniques. *J Pharmacol Toxicol Methods* **56**, 300-307.
- Sattler R., Charlton M.P., Hafner M., Tymianski M. (1998) Distinct influks pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J Neurochem* **71**, 2349–2364.
- Scott C.C., Furuya W., Trimble W.S., Grinstein S. (2003) Activation of store-operated calcium channels: assessment of the role of snare-mediated vesicular transport. *J Biol Chem* **278**, 30534-30539.
- Takano T., Oberheim N., Cotrina M.L., Nedergaard M. (2009) Astrocytes and ischemic injury. *Stroke* **40**, 8-12.

- Taoufik E., Probert L. (2008) Ischemic neuronal damage. *Curr Pharm Des* **14**, 3565-3573.
- Tu W., Xu X., Peng L., Zhong X., Zhang W., Soundarapandian M.M., Balel C., Wang M., Jia N., Zhang W., Lew F., Chan S.L., Chen Y., Lu Y. (2010) DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. *Cell* **140**, 222-234.
- Tymianski M., Charlton M.P., Carlen P.L. (1993) Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J Neurosci* **13**, 2085–2104.
- Vandame D., Desmadryl G., Becerril Ortega J., Teigell M., Crouzin N., Buisson A., Privat A., Hirbec H. (2007) Comparison of the pharmacological properties of GK11 and MK801, two NMDA receptor antagonists: towards an explanation for the lack of intrinsic neurotoxicity of GK11. *J Neurochem* **103**, 1682-1696.
- Vignes M., Collingridge G.L. (1997) The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* **388**, 179–182
- Villmann C., Becker C.M. (2007) On the hypes and falls in neuroprotection: targeting the NMDA receptor. *Neuroscientist* **13**, 594-615.
- Wang G.J., Thayer S.A. (1996) Sequestration of glutamate-induced Ca²⁺ loads by mitochondria in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* **76**, 1611–1621.
- Wang C., Nguyen H.N., Maguire J.L., Perry D.C. (2002) Role of Intracellular Calcium Stores in Cell Death From Oxygen-Glucose Deprivation in a Neuronal Cell Line *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 206–214.
- Wojda U., Salinska E., Kuznicki J. (2008) Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life* **60**, 575-590.
- Wollmuth L.P., Sobolevsky A.I. (2004) Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* **27**, 321-328.